



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

Instituto de Investigaciones Biomédicas

# Identificación de los péptidos homólogos que constituyen la vacuna S3Pvac en céstodos de importancia para la salud pública

**TESIS**

que para obtener el grado de

**Licenciada en Investigación Biomédica Básica**

Presenta

**Dunia Rassy Kuri**

**Directora de tesis: Dra. Edda Sciutto Conde**

**México, D.F., 2009**

Facultad de Medicina





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

لِأَبِي وَجَدِّي

أَعْرَفَ أَنْكُمَا إِنْتَظَرْتُمَا هَذِهِ اللَّحْظَةَ سِرًّا

## ¡Gracias!

A mi familia:

Por aguantarme los domingos con mis hojitas con ciclos de bioquímica en las comidas

Por regalarme en Navidad mamotretos en idiomas desconocidos

Por soportar ver unos cisticercos en vivo justo en mi cumpleaños

Por aguantar mis cátedras sobre el sexo de los mosquitos

Por transportar microbios de peluche en sus maletas

A mi mamá:

Por pararse todas las mañanas a hacerme el desayuno

Porque si no fuera por ella no hubiera estudiado esto

Por seguir luchando para estar conmigo

Al Monsieur:

Por las incontables horas que pasó en el tráfico de los viernes

Por ayudarme a entrar, permanecer y terminar esta carrera

A Edda:

Por adoptarme sin saber ni cómo agarrar micropipetas

A mis compañeros del lab:

Por ser un ejemplo

Por usarme de enciclopedia andante

Por la gran ayuda recibida

Por ser buenos oídos

Al Dr. Bobes:

Por ser un papá para mí estos 4 años

A mis compañeros de la LIBB, especialmente a Alfredo, Brenda, Paulette y Anna

A mis sinodales: Dra. Kaethe Willms, Dr. Fernando López Casillas y Dr. Juan Pedro Laclette, así como a Carmen Hinojosa, por ayudarme a mejorar este trabajo.

# Índice

|   |    |
|---|----|
| Resumen   | ii |
| 1. Introducción   | 1  |
| 1.1. Cisticercosis/Teniasis                                       |    |
| 1.1.1. <i>Taenia solium</i>                                       |    |
| 1.1.2. <i>Taenia saginata</i>                                     | 5  |
| 1.2. Equinococosis  | 7  |
| 1.2.1. <i>Echinococcus granulosus</i> -Hidatidosis                |    |
| 1.2.2. <i>Echinococcus multilocularis</i> -Equinococosis alveolar | 9  |
| 1.3. Vacunas  | 11 |
| 1.3.1. <i>Taenia solium</i>                                       |    |
| 1.3.2. <i>Taenia saginata</i>                                     | 13 |
| 1.3.3. <i>Echinococcus granulosus</i>                             | 14 |
| 1.3.4. <i>Echinococcus multilocularis</i>                         | 15 |
| 1.4. S3Pvac y sus ventajas como vacuna de péptidos sintéticos     | 16 |
| 1.4.1. Desarrollo de la vacuna S3Pvac                             | 19 |
| 1.4.1.1. KETc7  | 21 |
| 1.4.1.2. KETc1 y KETc12   | 22 |
| 2. Justificación  | 25 |
| 3. Hipótesis  |    |
| 4. Objetivos  |    |
| 5. Material y Métodos   | 27 |
| 5.1. Colección de parásitos                                       |    |
| 5.2. Extracción de ADN  | 29 |
| 5.3. Diseño de oligonucleótidos                                   |    |
| 5.4. Controles positivos y estandarización                        | 34 |
| 5.5. Amplificación de secuencias homólogas por PCR                | 35 |
| 5.6. Electroforesis   |    |
| 5.7. Purificación de bandas                                       | 36 |
| 5.8. Secuenciación  |    |
| 5.9. Análisis de secuencias                                       | 37 |
| 5.10. Genomas   | 38 |
| 6. Resultados   | 39 |
| 6.1. KETc1  |    |
| 6.2. KETc12   | 42 |
| 6.3. KETc7 (GK-1)   | 48 |
| 7. Discusión  | 53 |
| 7.1. KETc1  | 55 |
| 7.2. KETc12   | 57 |
| 7.3. GK-1   | 59 |
| 8. Conclusiones   | 61 |
| 9. Bibliografía   | 62 |
| Lista de abreviaturas   | 67 |
| Lista de Figuras y Tablas   | 68 |

## RESUMEN

Dentro de los helmintos, la familia *Taeniidae* incluye a los géneros *Taenia* y *Echinococcus*. Ambos géneros comprenden parásitos de mamíferos, teniendo como hospederos finales a carnívoros y como hospederos intermediarios a herbívoros. Los humanos pueden intervenir en estos ciclos e infectarse. Por la gran morbilidad y las pérdidas económicas que causan, las especies que se estudian con mayor interés y cuyas infecciones se desea prevenir son: *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis*. Las infecciones por estas cuatro especies son un gran problema tanto en países desarrollados como subdesarrollados.

La vacunación se ha propuesto como la opción más viable para combatir estas zoonosis. Han sido varias las iniciativas llevadas a cabo en esta dirección, pero para las cuatro especies estudiadas, los candidatos más prometedores no han sido probados en condiciones de infección natural. Las excepciones son S3Pvac para *T. solium* y EG95 para *E. granulosus*. S3Pvac tiene la ventaja de ser una vacuna sintética formada por tres péptidos: KETc1, KETc12 y GK-1. Estos tres péptidos provienen de una biblioteca de ADNc de *T. crassiceps*. Al estar las cuatro especies relacionadas con este último parásito, en este trabajo se decidió buscar las secuencias homólogas de los péptidos con el fin de extender, a futuro, el uso de la vacuna para prevenir infecciones por las cuatro especies.

La estrategia empleada para la identificación de las secuencias que codifican a los péptidos KETc1, KETc12 y GK-1 fue, brevemente, la siguiente: Usando las secuencias de ADNc de *T. crassiceps* dentro de las cuales se identificaron los péptidos de S3Pvac o los genomas de *T. solium* y *E. multilocularis*, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar las regiones homólogas del péptido mediante PCR. Se empleó ADN de *T. solium*, *T. crassiceps* y *T. saginata*, así como de *E. multilocularis* y *E. granulosus*. Las

bandas de PCR que correspondieron al tamaño esperado, se cortaron y el ADN se purificó para posteriormente ser secuenciado. Las secuencias obtenidas se compararon con las originales, con secuencias reportadas en GenBank, y con los genomas de *T. solium* y *E. multilocularis*.

Al estudiar las secuencias homólogas del péptido KETc1 en los céstodos, se encontró que cinco de los 12 aminoácidos que constituyen al péptido están conservados. Estos residuos se encuentran en posiciones que pudieran ser importantes para su antigenicidad. En las diferentes especies retiene su característica de ser un péptido rico en prolinas y serinas. Se encontraron algunos cambios específicos del género del céstodo.

En KETc12, cuya amplificación se logró al combinar varias estrategias, se observó que aun siendo el péptido más pequeño, es el que tiene un mayor número de variaciones entre los céstodos, algunas específicas del género. No obstante, las secuencias homólogas, al igual que la original, son ricas en leucinas. De manera interesante, se encontró que la secuencia homóloga en *T. solium* tiene una mutación sin sentido (nonsense) a la mitad.

Por último, GK-1 de 16 aminoácidos es el péptido más conservado entre los céstodos. Sólo tiene cambios en el primer residuo de su extremo amino, algunos tienen una alanina, mientras que otros tienen glicina. Es un péptido rico en prolinas y tirosinas.

Los resultados obtenidos ofrecen una buena perspectiva de la aplicación a largo plazo para combatir las cestodiasis estudiadas mediante la vacunación con S3Pvac. Las diferencias encontradas en las secuencias de aminoácidos proveen, además, una idea de los residuos claves para la antigenicidad y sus interacciones con el complejo principal de histocompatibilidad.

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los helmintos, la familia *Taeniidae* incluye a los géneros *Taenia* y *Echinococcus*. Ambos géneros comprenden parásitos de mamíferos que tienen como hospederos definitivos a carnívoros y como hospederos intermediarios a herbívoros (García *et al.*, 2007). Las infecciones por las diferentes especies pertenecientes a estos géneros representan un grave problema socioeconómico, que afecta a naciones desarrolladas y en desarrollo. Además de su impacto en la producción ganadera, la cisticercosis en cerdos (por *Taenia solium*), la infección en reses por *Taenia saginata* y la enfermedad hidatídica (*Echinococcus granulosus*) o alveolar (*Echinococcus multilocularis*) en animales domésticos se consideran infecciones zoonóticas de relevancia para la salud pública (Willingham III y Schantz, 2004). Por las razones anteriores, estos cuatro céstodos son las especies de mayor interés para el desarrollo de vacunas.

### 1.1 Cisticercosis/Teniasis

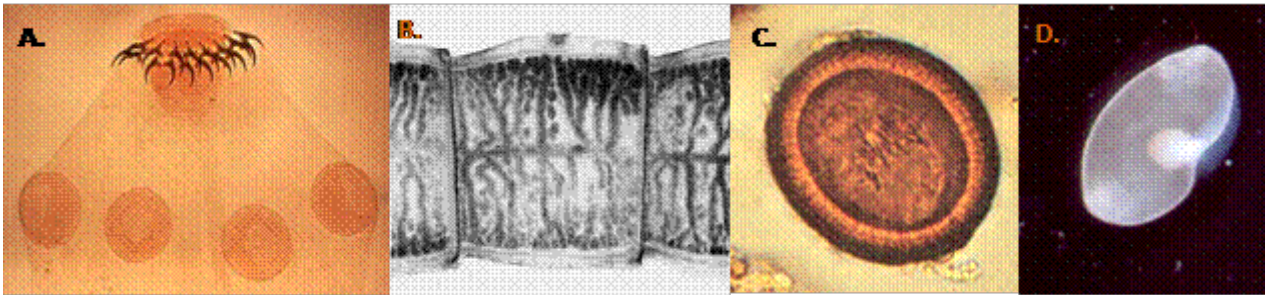
#### 1.1.1. *Taenia solium*

*Taenia solium* es un gusano plano que pertenece a la familia de los céstodos. Se distingue por tener un escólex en uno de sus extremos (Figura 1.1, A), el cual está armado con dos coronas de ganchos y cuatro ventosas que le permiten adherirse firmemente al intestino de sus hospederos. El resto del gusano consta de un cuerpo compuesto por segmentos llamados proglótidos (Figura 1.1, B) en los que se distinguen los órganos sexuales con diferente grado de diferenciación según su madurez (Flisser *et al.*, 2004; Singh y Prabhakar, 2002). Dentro del



hospedero, los proglótidos maduros producen huevos (Figura 1.1, C) que contienen los embriones u oncosferas que se liberan al medio.

Figura 1.1: Los diferentes estadios de *Taenia solium*. A. adulto (escólex), B. adulto (proglótido), C. huevo, D. cisticerco.



Imágenes tomadas del Centro de Control de Enfermedades, E.U. (A.); Cuerpos Médicos Navales, E.U. (B.); Cátedras de Medicina Tropical, Universidad McGill, Canadá (C.) y Dr. Jorge Tay Zavala, Facultad de Medicina, UNAM (D).

La cisticercosis en humanos se adquiere a través de la ingesta de alimentos contaminados con huevos (Figura 1.2, a). Los cerdos adquieren la cisticercosis mediante la ingesta de heces humanas en el suelo que contienen proglótidos (de Aluja y Larralde, 2006) o huevos (García *et al.*, 2007) (Figura 1.2, b) de *T. solium*. Estos eventos se favorecen por la forma de crianza de los cerdos de traspatio que deambulan en las comunidades en busca de alimentos, aunada a la falta de drenajes y a la práctica frecuente de fecalismo al ras del suelo en este medio (Flisser *et al.*, 2006). Mientras que los cerdos fungen como hospederos intermediarios para *T. solium*, los humanos son el único hospedero definitivo (García *et al.*, 2007).

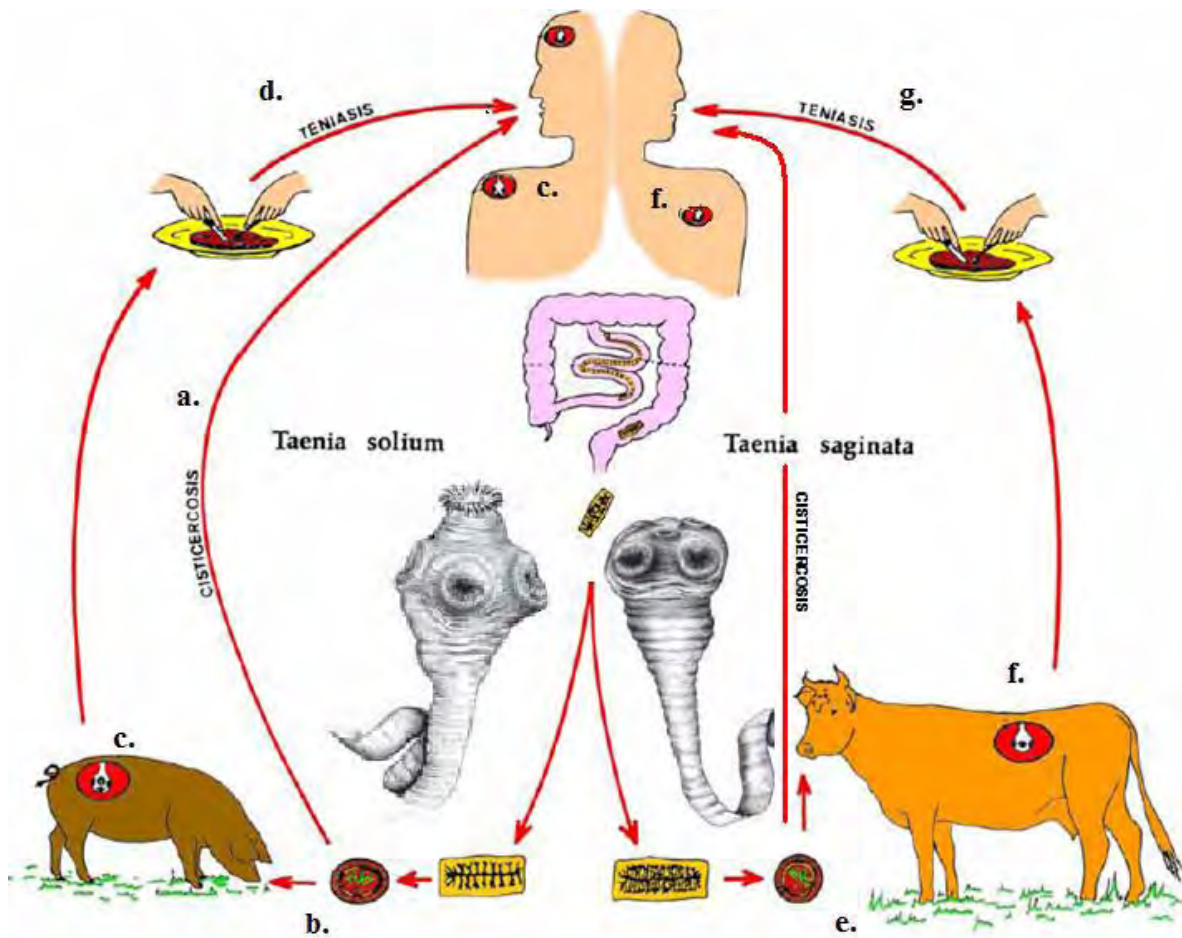
Una vez que los huevos son ingeridos por cerdos o humanos, llegan al intestino del hospedero, donde eclosionan, atraviesan la pared intestinal y se desarrollan en los tejidos, convirtiéndose en cisticercos. El cisticerco finalmente se establece en un órgano o tejido

(Figura 1.2, c), preferentemente en el sistema musculoesquelético o en el sistema nervioso central (neurocisticercosis). Esta última es la forma más frecuente en el hombre y a menudo provoca trastornos neurológicos debido al aumento de masa que implica la presencia del parásito en el encéfalo, así como por la respuesta inflamatoria que se establece.

Cuando se consumen cisticercos vivos (Figura 1.2, d), el parásito se adhiere al intestino por medio del escólex y se desarrolla hasta llegar a su fase adulta. A esta forma de la infección se le llama teniasis. El gusano en esta fase puede permanecer por años en el intestino del hospedero y es capaz de producir 300 mil huevos diariamente (Carpio 2002, y Rodríguez *et al.*, 2006), convirtiendo al hospedero en un foco de infección.

Se estima que 50 millones de personas en el mundo tienen cisticercosis. Sin embargo, se cree que estas estimaciones no consideran las infecciones subclínicas. La cisticercosis es endémica en varias regiones de América Latina, África Subsahariana, la India y Asia (White Jr., 2007). La prevalencia en estos países varía, pudiéndose encontrar, por ejemplo, en México cifras de alrededor de 3% (Yeh y Sheffield, 2008), mientras que en varios países de África es de 10% (Organización Mundial de la Salud, 2009). Aunque a nivel mundial se desconoce con precisión el impacto que esta infección tiene en la economía, en México se calcula que anualmente la cisticercosis porcina incurre en pérdidas de más de la mitad de las inversiones que se realizan en ganadería (Schantz, 2006). El mismo autor refiere que en el país se gastan alrededor de 17 millones de dólares al año en hospitalización y tratamiento de pacientes con neurocisticercosis.

Figura 1.2: Ciclos de vida de *Taenia solium* y *Taenia saginata*



Imágenes de *Taenia solium* y *Taenia saginata* adultos tomadas de: Portrait of human tapeworms.

Flisser A, Viniestra AE, Aguilar-Vega L, Garza-Rodriguez A, Maravilla P, Avila G. *J Parasitol.* 2004 Aug;90(4):914-6. Ciclo modificado del original por José Manuel Übeda Ontiveros, Universidad de Sevilla.

A pesar de los avances en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la cisticercosis y teniasis, la pobreza y la ignorancia frecuentemente obstaculizan cambios en conductas y en el ambiente que ayuden a erradicar o disminuir la frecuencia de infecciones. En 1993 la International Task Force for Disease Eradication declaró que las infecciones por *T. solium* eran potencialmente erradicables (Schantz 2006). Esto se debe a características propias del ciclo de

vida del parásito, como el hecho de que los humanos seamos el huésped definitivo, que los cerdos no vivan por largos períodos y que el parásito no tenga reservorios silvestres.

### 1.1.2. *Taenia saginata*

Las infecciones por *Taenia saginata* son mucho más comunes que las de *T. solium*, pero su baja patogenicidad hace que muchas veces no se diagnostiquen (Thomasson-Crompton y Savioli, 2006). De acuerdo a Dorny y Praet (2007), la presencia de este helminto en su fase adulta en el intestino de los humanos sólo produce diarrea moderada, pérdida de peso y una sensación desagradable en el abdomen.

Al contrario de *T. solium*, *T. saginata* tiene una baja especificidad para infectar hospederos intermediarios, pero los humanos parecen siempre ser el hospedero definitivo (Thomasson-Crompton y Savioli, 2006). Los bovinos normalmente son los hospederos intermediarios y adquieren la infección al pastar, comer forraje o beber agua contaminada con huevos (Figura 1.2, e), (Wanzala *et al.*, 2003). Cuando los embriones u oncosferas maduran, penetran la mucosa intestinal, migran por la circulación, al igual que los huevos de *T. solium* se alojan en los músculos para formar cisticercos (Figura 1.2, f). Si el ganado se encuentra infestado por cisticercos de *T. saginata*, puede desarrollar miocarditis o fallas cardíacas. No obstante, los cisticercos, tanto en humanos como en animales, degeneran alrededor de los 9 meses (Dorny y Praet, 2007), aunque pueden sobrevivir hasta tres años (Thomasson-Crompton y Savioli, 2006). Por otro lado, si un humano consume carne cruda o mal cocida de una res infectada

(Figura 1.2 g), el cisticerco evagina y se adhiere al intestino mediante el escólex, dando lugar a la forma adulta que comienza a liberar proglótidos maduros.

*T. saginata* se encuentra distribuida prácticamente en todos los países donde se practica la ganadería bovina aunada a malas prácticas de higiene. Los factores que favorecen la transmisión de esta cestodiasis son el manejo inadecuado de las heces y el consumo de carne de res cruda o mal cocida, además de la falta de programas de inspección de carne, (Sheikh *et al.*, 2009). La infección por *T. saginata*, a la cual se le denomina también teniasis, es común en África, Europa del Este, el sudeste de Asia, y América Latina.

Aunque esta infección no es un problema grave para la salud humana como lo es la infección por *T. solium*, sí lleva a grandes pérdidas económicas en la ganadería. Un artículo de 2003 de Wanzala revela datos sobre pérdidas en las últimas décadas: Por ejemplo, en Kenia y Botswana en 1978, las pérdidas anuales ascendieron a 12 y 6 millones de dólares, respectivamente<sup>1</sup>. En el mismo año, el Reino Unido tuvo pérdidas estimadas en casi 10 millones de dólares. Las pérdidas anuales para el continente africano en 1983 fueron de alrededor de 7 mil millones de dólares, esto con una tasa promedio de infección de 7%. En América del Sur, con una prevalencia promedio de 2%, la cisticercosis bovina en 1997, aunada a la cisticercosis porcina, produjo pérdidas anuales de 735 millones de dólares.

---

<sup>1</sup> Las cifras mostradas fueron ajustadas a su valor actual usando: Lawrence H. Officer, "Five Ways to Compute the Relative Value of a UK Pound Amount, 1830 to Present," Measuring Worth, 2008. URL <http://www.measuringworth.com/ukcompare/> y Samuel H. Williamson, "Six Ways to Compute the Relative Value of a U.S. Dollar Amount, 1774 to present," Measuring Worth, 2008. URL <http://www.measuringworth.com/uscompare/> con la opción "relative share of GDP".

## 1.2. Equinococosis

Las especies pertenecientes al género *Echinococcus* son, en su fase adulta, céstodos pequeños, de 2-3 milímetros de largo, generalmente con tres proglótidos: uno inmaduro, uno maduro y otro grávido (Bush *et al.*, 2001). Las especies más importantes de este género son *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis* (Baker *et al.*, 2000). Sus ciclos de vida involucran a carnívoros como hospederos finales y a herbívoros como hospederos intermediarios. Los humanos son un hospedero intermediario accidental (García *et al.*, 2007).

### 1.2.1. *Echinococcus granulosus*- Hidatidosis

La infección por *Echinococcus granulosus* causa en humanos y animales una enfermedad denominada hidatidosis. Cuando un hospedero intermediario consume huevos de *E. granulosus*, se libera una oncosfera (larva) que se introduce a la circulación sanguínea o linfática para transportarse al hígado, pulmones u otros órganos (Figura 1.3). En ellos, la larva o metacéstodo forma quistes hidatídicos (McManus *et al.*, 2003). Dentro de la naturaleza, los hospederos intermediarios son borregos, cabras, cerdos, caballos y otros ungulados, pero también pueden infectarse marsupiales, roedores, conejos y humanos (Eckert y Deplazes, 2004). Los hospederos definitivos, que por lo general son perros y otros cánidos, se infectan al consumir vísceras que contienen quistes hidatídicos con protoescólices viables. Tras la ingestión, el protoescólex evagina y se une a la mucosa intestinal para desarrollarse a la fase adulta, donde el hospedero defeca huevos y proglótidos maduros.

La poca especificidad de hospederos intermediarios y definitivos que tiene *E. granulosus* se puede explicar por la gran variación genética que posee (Eckert y Deplazes, 2004). Esta variación genética puede afectar también su antigenicidad, su sensibilidad/resistencia a agentes quimioterapéuticos y el tipo de patología que se desarrolla (McManus *et al.*, 2003).

Los quistes producidos por este parásito son masas que crecen lentamente, equiparables con neoplasmas benignos. Sin embargo, la mayoría de los casos son asintomáticos. Las manifestaciones clínicas son muy variables y dependen del sitio, tamaño y condición de los quistes. Si los quistes son mayores a 10 centímetros de diámetro, generalmente se extraen utilizando la técnica denominada PAIR, por sus siglas en inglés. PAIR (puncture, aspiration, injection and re-aspiration) consiste en perforar el quiste, aspirar su fluido, inyectar algún compuesto que destruya los protoescolices y aspirar por segunda vez el líquido del quiste (García *et al.*, 2004).

*E. granulosus* se puede encontrar en todos los continentes, aunque los lugares con mayor prevalencia son la región del Mediterráneo, Rusia y los estados que constituyeron la URSS, China, el norte y el este de África, Australia y América del Sur (McManus *et al.*, 2003). En general, todas aquellas comunidades que se dedican a la ganadería ovina están predispuestas a una mayor tasa de infección (Schantz, 2006).

A pesar de que no es una infección con alta tasa de mortalidad, la morbilidad es considerable. Varios pacientes requieren intervenciones quirúrgicas múltiples, que además afectan la economía familiar. Aunque se pueden usar pruebas serológicas para su detección, las únicas

confiables son las de imagenología, como ultrasonido, radiografía, tomografía y resonancia magnética (Schantz, 2006).

El ciclo de vida de *E. granulosus* se puede interrumpir si se adoptan medidas para evitar que los hospederos intermediarios consuman vísceras de animales infectados (Schantz, 2006). En algunos países como Nueva Zelanda, Argentina, Chile y Chipre se han hecho campañas masivas de desparasitación de perros con buenos resultados (McManus *et al.*, 2003). La experiencia ha demostrado que mientras las medidas se apliquen de manera consistente por un periodo considerable de tiempo, es posible disminuir la transmisión.

#### 1.2.2. *Echinococcus multilocularis*- Equinococosis alveolar

El ciclo de vida de este céstodo incluye animales silvestres como zorros (hospederos definitivos) y roedores (hospederos intermediarios) que habitan alejados de los humanos (Figura 1.2). No obstante, algunas veces las mascotas, perros o gatos, se infectan al comer roedores, generando la transmisión a nivel domiciliario (Schantz, 2006). Los coyotes, lobos y algunos felinos salvajes también pueden fungir como hospederos definitivos (Eckert y Deplazes, 2004).

El ciclo de vida de *Echinococcus multilocularis* en los hospederos definitivos sucede de igual forma que en las infecciones por *E. granulosus*, como se puede observar en la Figura 1.3. Una vez que el hospedero intermediario ingiere al metacéstodo de *E. multilocularis*, se da un periodo asintomático que puede ir de cinco hasta quince años. Mientras tanto el metacéstodo,



que tiene una estructura alveolar, se aloja en el 99% de los casos en el hígado, donde prolifera tal como lo haría un tumor (McManus *et al.*, 2003).

Figura 1.3: Ciclos de vida de *Echinococcus granulosus* y *multilocularis*

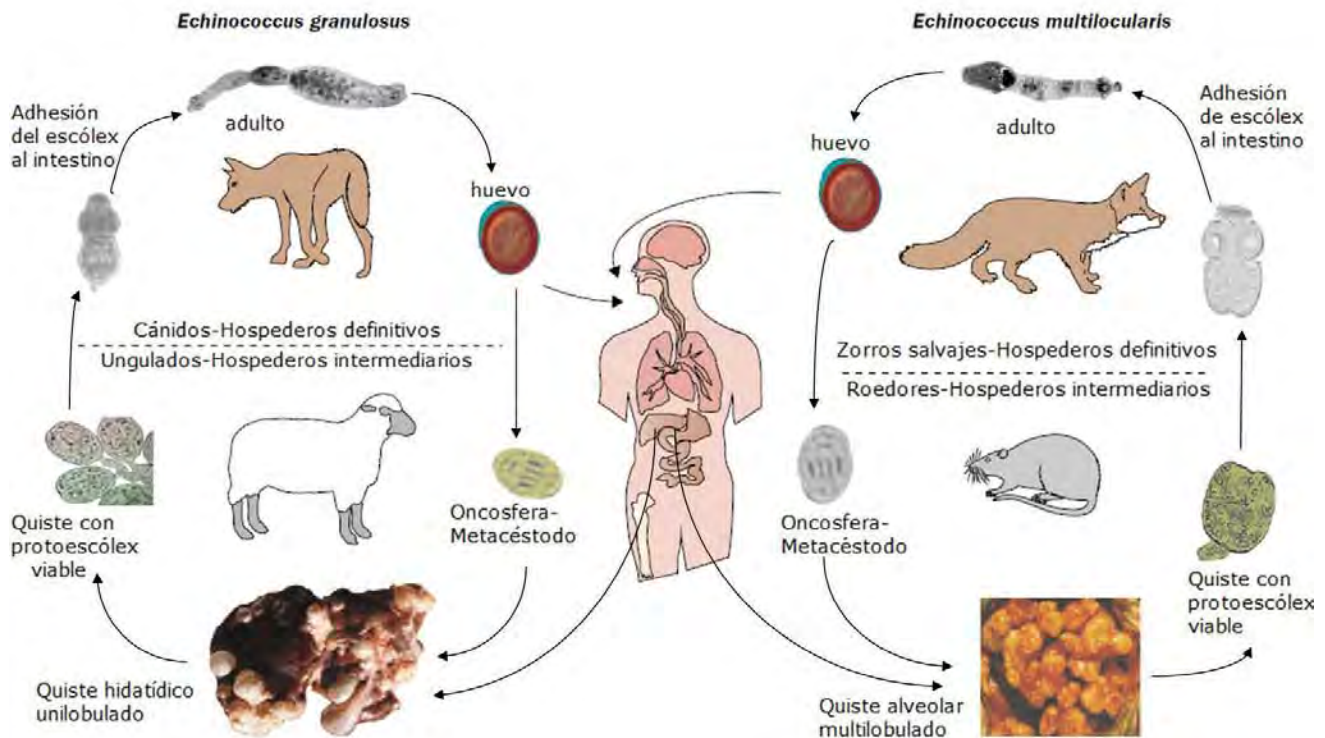


Figura modificada a partir de la original por McManus *et al.* en Echinococcosis, The Lancet, Vol. 362, 18/10/03

El tejido del hígado es invadido gradualmente por el quiste multilobulado (por eso se le llama equinococosis alveolar) y reemplazado por tejido fibroso. Si no se diagnostica a tiempo, los hospederos infectados mueren por falla hepática o incluso metástasis en el cerebro (García *et al.*, 2007). El diagnóstico se lleva a cabo por las mismas técnicas que para *E. granulosus* además de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El tratamiento de elección es la cirugía, combinada con quimioterapia para evitar su reaparición.

*E. multilocularis* se encuentra distribuido, sobre todo, en el hemisferio norte. En Europa se puede encontrar en países occidentales como Alemania, pero también meridionales como Bulgaria y Turquía. Schantz (2006) afirma que Rusia y varias naciones de la ex-URSS, junto con China, algunas islas japonesas y Alaska tienen infecciones recurrentes de *E. multilocularis*. Aunque se han tomado medidas en los países anteriormente mencionados, el hecho de que el ciclo de infección tenga varios reservorios silvestres y diferentes hospederos definitivos, ha impedido romper con él. Dadas las múltiples especies que *E. multilocularis* afecta, incluyendo especies de vida libre, las posibilidades de prevención a través de vacunación parecen limitadas (McManus *et al.*, 2003).

### 1.3. Vacunas

#### 1.3.1. *Taenia solium*

La identificación del cerdo como hospedero intermediario indispensable para mantener la transmisión lo colocó como el blanco idóneo para interrumpir el ciclo del parásito.

Sin embargo, el desarrollo de vacunas se ha enfrentado a limitaciones para disponer regularmente de huevos y llevar a cabo los desafíos experimentales. Esto se debe a que el gusano adulto sólo se puede encontrar de manera esporádica en humanos, aun en zonas endémicas. Así, son pocos los datos al respecto de inmunidad en infecciones experimentales (Lightowers *et al.*, 2003).

No obstante, las dificultades arriba mencionadas se han podido sortear de diferentes formas por los grupos de investigación. El modelo de cisticercosis por *Taenia hydatigena* fue en un inicio muy utilizado para infecciones experimentales (Lawson y Gemmel, 1989). Mientras tanto, en nuestro grupo de investigación se utilizó como modelo experimental la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*. Este modelo ha permitido la identificación de los antígenos que constituyen la vacuna S3Pvac contra cisticercosis porcina, como se detalla más adelante. Varias observaciones demostraron la reactividad cruzada con sueros de *T. solium*, y experimentos *in vivo* han demostrado su utilidad (Valdez *et al.*, 1994, Manoutcharian *et al.*, 1995; Gevorkian *et al.*, 1996). Cabe mencionar que S3Pvac es la única vacuna para *T. solium* que se ha evaluado en condiciones naturales de transmisión (Huerta *et al.*, 2001).

Han existido también varios intentos por producir vacunas de ADN con niveles de protección desde 73 hasta 99% (Rosas *et al.*, 1998; Sciutto *et al.*, 2007). El primer intento evaluado en cisticercosis porcina, desarrollado por Cai y colaboradores (2001), consistió en ligar el gen del antígeno B (paramiosina) al vector PV93 y transformar una cepa especial de *Escherichia coli* denominada JM83. En otro estudio (Wang *et al.*, 2003) se utilizó el antígeno Cc1 proveniente del metacéstodo clonado dentro del vector pcDNA3 para transfectar células COS7. Al probar la construcción en ratones BALB/cAnN infectados con huevos de *T. solium* se encontró una reducción de hasta 73% en el número de cisticercos. El grupo de Wu (2005) retomó los péptidos de la vacuna S3Pvac y los fusionó con un antígeno de la hepatitis B. La combinación ofreció un 83% de protección en cerdos infectados con huevos. Dos propuestas más combinaron las mencionadas anteriormente: Una retomó al antígeno Cc1 clonado en pcDNA3

y la combinaron con refuerzos de Cc1-GST logrando hasta un 85% de protección (Guo *et al.*, 2004); la otra exploró la protección usando pcDNA3 con el antígeno B, obteniendo un 92.6% en cerdos (Guo *et al.*, 2007). Desgraciadamente, no se han publicado más pruebas con estas construcciones.

Se han identificado diferentes antígenos de oncosferas de *T. solium* de interés para vacunación. Tras identificar algunos antígenos protectores en *T. ovis*, Gauci y Lightlowlers (2003) decidieron buscar las proteínas homólogas de To45W, To16 y To18 usando Southern blots. De estos antígenos, dos se clonaron y se expresaron en *E. coli* como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). Ésta ofrece una mayor facilidad para purificar y detectar las proteínas de interés (Singleton, 2004).

### 1.3.2. *Taenia saginata*

La investigación en *Taenia saginata* ha seguido una línea similar a la de *T. solium* y se ha enfrentado a los mismos retos. La identificación de tres antígenos protectores del hospedero en *Taenia ovis* y la gran reactividad cruzada que existe entre las especies de *Taenia*, dio pie a que se investigara si estas tres proteínas, To45W, To18 y To16, protegían también en infecciones por *T. saginata*. Por medio de Southern blots, se identificaron las secuencias homólogas para cada una de ellas en el genoma de *T. saginata* (Lightowlers *et al.*, 1996). Posteriormente se hizo una inmunodetección en una biblioteca de ADNc de oncosferas. Las secuencias homólogas se buscaron mediante el uso de sondas hibridadas de ADNc de *T. ovis*.

De esta forma se identificaron los homólogos de los genes *To45W* y *To18*. Las secuencias se clonaron en el vector pGEX y se expresaron en *E. coli* como proteínas de fusión GST (Glutación S-transferasa). Se encontró que, para proteger al hospedero, se requería vacunar con las dos proteínas de manera simultánea. Sólo así se logró una protección de 94-99% en el ganado vacuno (Lightowers *et al.*, 2003).

De manera independiente, el grupo de investigación de Ferrer (2003) clonó *To18*. El antígeno, al cual denominaron inicialmente HP6, fue identificado como el blanco de un anticuerpo monoclonal contra una proteína de secreción de la oncosfera de *T. saginata*.

### 1.3.3. *Echinococcus granulosus*

En 1983 Osborn y Heath demostraron que se podían proteger borregos de la infección por *E. granulosus* inmunizando con antígenos obtenidos de la oncosfera. Hasta que los métodos de ADN recombinante emergieron, no fue posible producir estos antígenos a gran escala. Por medio de la inmunodetección con una biblioteca de ADNc no se lograron obtener clonas protectoras (Lightowers *et al.*, 2003). Por lo tanto, se repitió el ensayo con suero de borregos híperinmunizados contra oncosferas de este céstodo. Las clonas que resultaron positivas se agruparon y se introdujeron en *E. coli*. De esta forma, las bacterias contenían títulos altos de antígeno. Se seleccionaron algunas de las clonas, se subclonaron en un vector como proteínas de fusión GST y se probaron en borregos. Dentro de éstos, la clona EG95 indujo el mayor nivel de protección en el hospedero (Lightowers *et al.*, 1996). Ensayos subsecuentes en Nueva Zelanda, Australia, Argentina y China han demostrado su efectividad.

Otra alternativa, además de EG95 es la clonación del antígeno de Shi y colaboradores (2009) para el diagnóstico de hidatidosis, P-29. Los ratones infectados vacunados con la versión recombinante de este antígeno tuvieron una protección de casi 97% en comparación con los controles. El grupo de Zhang (2006), por otra parte, clonó tres genes que se expresan en la fase adulta de *E. granulosus* denominados EGM4, EGM9 y EGM123 en *E. coli* con GST, también. La vacuna se probó en perros usando tres dosis y lograron suprimir en un 97-99% el crecimiento del parásito, el desarrollo de huevos y la embriogénesis.

#### 1.3.4. *Echinococcus multilocularis*

A pesar de que la vacunación de hospederos intermediarios no tendría un mayor efecto en el control de la hidatidosis alveolar, se cree que la vacunación podría ser útil en zonas endémicas si se dirige hacia humanos. El análisis mediante Southern blot del genoma de *E. multilocularis*, ha demostrado que existen secuencias homólogas a las de EG95 (Lightowlers *et al.*, 2003). Tras clonarlas y expresarlas en *E. coli*, se demostró que también inducían protección en una infección experimental con huevos de *E. multilocularis* en ratones. Kouguchi y coautores (2007) lograron identificar una clona de ADNc similar en cuanto a estructura al homólogo de EG95 (EM95). Por medio de un PCR de retrotranscripción (RT-PCR) observaron que su proteína, a la cual denominaron EMY162, estaba presente en todos los estadios de *E. multilocularis* y su expresión era mayor que EM95. En ratones infectados, EMY162 ofreció una protección del 74.3%, además de reaccionar con sueros de humanos infectados. El equipo de Müller-Schollenberger (2001) expresó la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

recombinante de *E. multilocularis* en *E.coli* y en *Salmonella typhimurium* y se evaluaron diferentes formas en ratones infectados con huevos de este parásito, pero no hubo protección. Otro grupo más (Siles-Lucas *et al.*, 2003) utilizó la versión recombinante de la proteína 14-3-3 de la oncosfera involucrada con el desarrollo del metacéstodo para vacunar ratones infectados. A pesar de que la proteína protege contra una infección primaria, no es así si existe una infección secundaria.

#### 1.4. S3Pvac y las ventajas de las vacunas subunitarias

Las vacunas desarrolladas a partir de agentes atenuados, inactivados o muertos presentan diferentes limitaciones, entre las que figuran depender de cultivos *in vitro* para su producción y controlar posibles variaciones en la cepa que se usa (Purcell *et al.*, 2007). Además, tienen dificultades de almacenamiento y posiblemente incluyen de materiales contaminantes. Adicionalmente, es frecuente que las vacunas basadas en los patógenos completos puedan presentar efectos colaterales no deseados, como fiebre, irritación local o alergia a los componentes (Toledo-Rojas, 1999).

Una de las alternativas para desarrollar vacunas subunitarias es el uso de epítopes protectores producidos en forma sintética. La primera vacuna de este tipo fue desarrollada contra la difteria en 1982 (Audibert *et al.*). Posteriormente esta vacuna fue superada por otras versiones que incluían además el uso de acarreadores y adyuvantes. El uso de adyuvantes es recomendable, ya que la mayoría de las secuencias empleadas en las vacunas sintéticas son

muy pequeñas y poco inmunogénicas. Sin embargo, en el caso de S3Pvac, el péptido GK-1 parece tener propiedades que le ayudan a actuar al mismo tiempo como adyuvante (Segura-Velázquez *et al.*, 2006). De hecho, este componente de la vacuna S3Pvac es capaz de potenciar el efecto inducido por la vacuna de influenza. Así, la coadministración de GK-1 con la vacuna de influenza indujo en ratones una mayor producción de anticuerpos contra influenza que la vacuna sola y atenuó la respuesta inflamatoria en los alvéolos pulmonares de los ratones vacunados.

Existen otras ventajas que se mencionan en la revisión de Purcell, McCluskey y Rossjohn (2007) acerca de las vacunas sintéticas. La primera de ellas es que el hecho de que sean químicamente definidas y puras facilita su aprobación por parte de las autoridades sanitarias, además de simplificar su síntesis a gran escala. Las vacunas de este tipo pueden contener modificaciones especiales que les confieran propiedades adicionales. Por ejemplo, se pueden remover secuencias oncogénicas o añadir grupos funcionales inmunopotenciadores. Al contrario de otros tipos de vacunas, éstas pueden ser multivalentes con varios determinantes de diferentes patógenos o varios epítopes del mismo patógeno (como S3Pvac). Algo que resulta muy práctico es que estas vacunas se pueden liofilizar, al contrario de la mayoría, que requiere de refrigeración para su almacenamiento y distribución.

S3Pvac, que se desarrolló en el grupo de investigación donde se realizó también esta tesis, está compuesta por tres péptidos sintéticos, GK-1, KETc1 y KETc12, cuya caracterización se describe más adelante. La vacuna consiste en una mezcla 1:1:1 de los tres péptidos cuyas



secuencias de aminoácidos son: GK-1 (GYYYPSDPNTFYAPPYSA), KETc1 (APMSTPSATSVR) y KETc12 (GNLLLSCL). Se ha demostrado que la inmunización de cerdos con S3Pvac destruye los cisticercos previamente instalados en desafíos experimentales, generando a su alrededor una exacerbada respuesta inflamatoria e infiltrado linfocitario (de Aluja *et al.*, 2005, Manoutcharian *et al.*, 2004, Toledo *et al.*, 2001).

Considerando que la vacuna estaba destinada a cerdos de traspatio de bajo costo adquisitivo, la vacuna producida en forma sintética resultaba de alto costo, consideración que nos llevó a expresarla en distintos sistemas recombinantes: fagos filamentosos y callos embriogénicos de papaya transgénica (Sciutto *et al.*, 2007). La versión expresada en fago ya ha sido optimizada para su producción masiva y se ha validado su potencial protector en campo en condiciones naturales de transmisión (Morales *et al.*, 2008).

Se han utilizado otros sistemas de expresión para la producción recombinante de antígenos de interés en vacunación contra cisticercosis. El más utilizado consiste en tener el antígeno como proteínas de fusión con GST (glutatión S-transferasa) expresadas *en E. coli*. A pesar de que en teoría se podrían producir en grandes cantidades, la producción a gran escala de este tipo de proteínas recombinantes por lo general enfrenta problemas. Ejemplos de ellos son que la proteína se exprese en cuerpos de inclusión insolubles (Dempster *et al.*, 1996), la pérdida de material al purificar la proteína o la existencia de formas inestables de la misma.

Una prueba independiente de la efectividad de los componentes de S3Pvac fue realizada por Wu y sus colegas (2005). Mediante la inserción de KETc1, KETc12 y GK-1 en una proteína

de la hepatitis B, crearon una vacuna de ADN. Al usarla en la infección experimental con cerdos encontraron una protección de 83%. Además, el hecho de que se hayan usado huevos de *T. solium* de otro continente y que aun así haya habido una buena respuesta protectora, indica que S3Pvac puede ser útil a pesar de diferencias genéticas entre cisticercos de distinto origen geográfico (Sciutto *et al.*, 2007).

#### 1.4.1. Desarrollo de la vacuna S3Pvac

Con el fin de identificar antígenos provenientes de *T. crassiceps* con capacidad protectora que pudieran emplearse en una vacuna contra la cisticercosis, Valdez *et al.*, (1994) inmunizaron ratones con doce diferentes fracciones antigénicas provenientes de extractos totales de antígeno de cisticercos de *T. crassiceps*. Los antígenos se separaron por medio de electroforesis. La capacidad protectora se probó para las doce fracciones del gel infectando ratones de la cepa BALB/cAnN con larvas de *T. crassiceps*. A partir de ese estudio se observó que las fracciones de 56, 66 y 74 kDa reducían considerablemente la carga parasitaria en los ratones infectados.

Ya antes se había demostrado la reactividad cruzada para antígenos entre *T. crassiceps* y *T. solium* augurando la posibilidad de usar estos antígenos para combatir la cisticercosis porcina (Valdez *et al.*, 1994, Manoutcharian *et al.*, 1995; Gevorkian *et al.*, 1996). Además se encontró que estos antígenos estaban presentes en las fases tempranas del desarrollo del cisticerco

relacionadas con la instalación del parásito en el huésped. Debido a todo lo anterior, se decidió producir estos antígenos de forma recombinante.

En una biblioteca de ADNc de *T. crassiceps* de la cepa ORF se buscaron las clonas que correspondían a las fracciones de 56 y 74 kDa. Para identificarlas se usaron anticuerpos policlonales provenientes de conejo específicos para las fracciones (Manoutcharian *et al.*, 1995 y 1996). De 180 mil clonas, se seleccionaron trece como específicas para los antígenos. Posteriormente, de esas trece clonas se seleccionaron cinco empleando sueros de cerdos cisticercosos. Las clonas se denominaron KETc1, KETc4, KETc7, KETc11 y KETc12. Mediante un Western blot usando anticuerpos contra cada una de las clonas, se encontró que KETc1, 4 y 7 correspondían al antígeno de 56kDa, mientras que KETc11 y 12 correspondían al de 74kDa. La capacidad protectora de las clonas se evaluó infectando hembras y machos de la cepa BALB/cAnN, obteniendo protecciones mayores a 24% (Manoutcharian *et al.*, 1996). Tras observar que KETc4 ofrecía protección limitada y KETc11 facilitaba la infección, sólo se decidió seguir estudiando a KETc1, KETc7 y KETc12, que protegieron al 76, 73 y 84% ,respectivamente, de los ratones infectados (Manoutcharian *et al.*, 1995). Cabe mencionar que hasta la fecha no se cuenta con las secuencias completas de los genes de donde provienen estas clonas protectoras ni se ha trabajado más en la caracterización de las fracciones de 56 y 74 kDa. Se desconoce por completo la función que pudieran estar desempeñando estas clonas en la naturaleza.

A continuación se detallan las propiedades de los péptidos KETc1, KETc7 y KETc12 que se incluyeron en la vacuna S3Pvac.

#### 1.4.1.1. KETc7

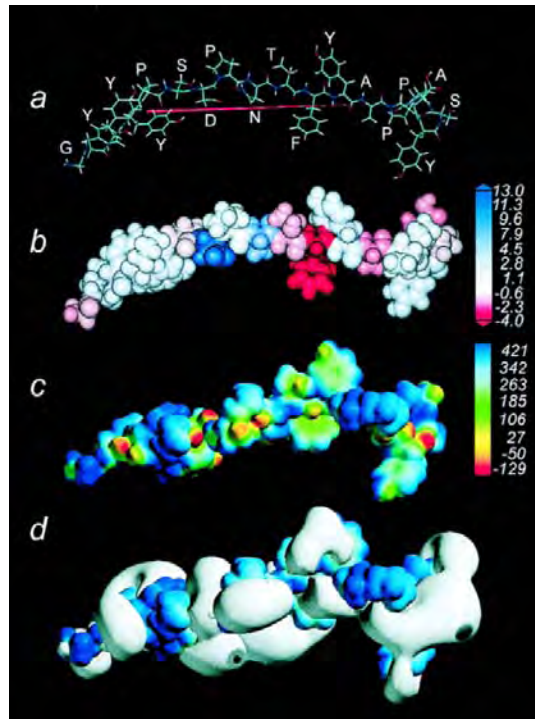
A partir de los resultados de la inmunodetección se secuenció la clona denominada KETc7. Se encontró que ésta corresponde al extremo 3' de un gen debido a la presencia de la cola poli(A). Al llevar a cabo la traducción de este fragmento de 445 pares de bases (pb), se encontraron polipéptidos ricos en prolina con capacidad de funcionar como epítopes protectores (Toledo *et al.*, 1999). A éstos se les denominó GK-1, GK-2 y GK-3 (Figura 5.2) y se observó que reaccionaban con sueros de humanos y cerdos infectados por *T. solium*. En su evaluación dentro de un modelo de infección murina, sólo GK-1, un péptido lineal de 18 aminoácidos, protegió al 97% de los ratones infectados. En este mismo trabajo se determinó por inmunolocalización que este péptido se encuentra presente en el tegumento de *T. crassiceps*, y en los huevos, oncosferas, cisticerco y gusano de *T. solium* (Figura 1.5).

De manera interesante, en el mismo artículo Toledo y colegas (1999) reportan estudios fisicoquímicos de GK-1 que arrojan propiedades adecuadas para ser un epítope protector. Si se asume que una mejor afinidad del epítope a su receptor promueve una mejor respuesta en el sistema inmune, su momento dipolar elevado y su distribución electrónica parecen propiedades importantes.

El hecho de que GK-1 cuente con una dualidad hidrofílica-hidrofóbica (Figura 1.4) le puede conferir una mayor facilidad para interactuar con membranas celulares de linfocitos B y T. Los grupos aromáticos intercalados que forman enlaces no covalentes podrían optimizar su presentación. Por medio de programas computacionales se determinó que este péptido

interactúa con el complejo principal de histocompatibilidad de clase I. Esto explicaría la gran actividad de proliferación de linfocitos CD8+ que se observó de forma experimental.

Figura 1.4: Estructura del péptido GK-1, dónde se muestran las regiones hidrofóbicas (b), su densidad electrónica (c) y su potencial electrostático (d).



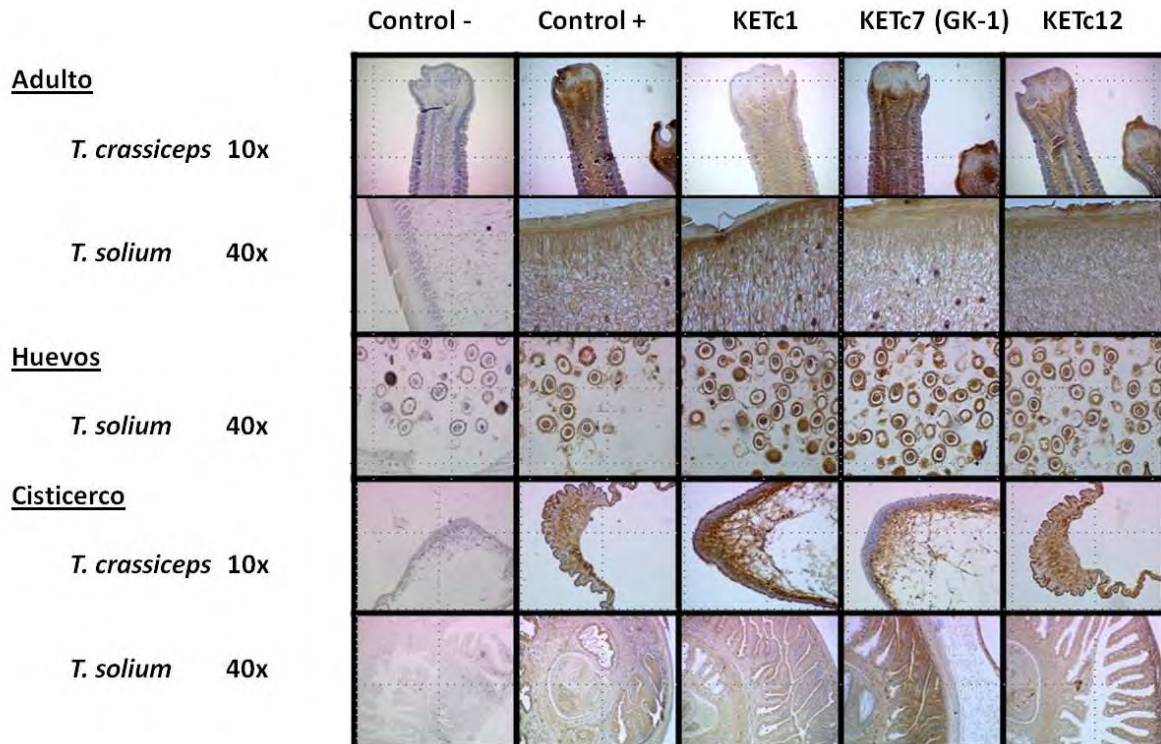
Tomado de: Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. Toledo A. *et al.*, *Infection & Immunity* 1999 May;67(5):2522-30.

#### 1.4.1.2. KETc1 y KETc12

A partir de la secuenciación de la clona denominada KETc1, se sintetizó un péptido de 12 aminoácidos al cual se le denominó también KETc1. En un estudio realizado en el 2001 (Toledo *et al.*), se evaluó la capacidad protectora del péptido y se definió su inmunolocalización en los diferentes estadios de *T. crassiceps* y *T. solium*. KETc1 indujo una protección de alrededor de 80% en el modelo experimental de cisticercosis murina. Se

encontró, tal como se puede observar en la Figura 1.5, que este péptido se expresa en la parte superficial del tegumento de cisticercos de *T. crassiceps*. Además, en *T. solium*, KETc1 se encuentra en los pliegues circulares del canal espiral.

Figura 1.5: Localización de los péptidos en diferentes estadios de *T. crassiceps* y *T. solium* por inmunohistoquímica.



(Imágenes no publicadas)

El caso de KETc12 es similar. A partir de su secuenciación, se sintetizó un péptido de ocho aminoácidos que retuvo el nombre de KETc12. Al probar su capacidad protectora, se observó que 65% de los ratones infectados tenían un menor número de parásitos que los controles (Toledo *et al.*, 2001). Este péptido se encuentra localizado en el tegumento de los cisticercos

de *T. crassiceps* y *T. solium* (Figura 1.5). KETc12 se puede encontrar además en el parénquima y en las oncosferas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Considerando la capacidad protectora y terapéutica de los péptidos incluidos en la vacuna S3Pvac, resulta de interés su identificación en otros céstodos. Esta información permitiría considerar el potencial uso de estos inmunógenos para la prevención de otras parasitosis-zoonosis que afectan a diferentes especies de mamíferos y que tienen una gran importancia dentro de la salud pública y la economía. Asimismo, son frecuentes las infecciones por dos o más de los céstodos estudiados en este trabajo, en una misma región geográfica. Tan solo en nuestro país son endémicas *Taenia solium*, *Taenia saginata* y *Echinococcus granulosus*. El usar una sola vacuna para prevenir las tres infecciones es altamente deseable desde el punto de vista médico, veterinario y económico.

## 3. HIPÓTESIS

Los péptidos KETc1, KETc12 y GK-1 tienen sus respectivos péptidos homólogos en los céstodos *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus granulosus*.

## 4. OBJETIVO

General: Identificar las secuencias homólogas de los péptidos de la vacuna S3Pvac (KETc1, 12 y GK-1).

Particulares:

- Amplificar las regiones homólogas de los tres péptidos en *T. solium*, *T. saginata*, *E. granulosus* y *E. multilocularis*.
- Obtener las secuencias homólogas de nucleótidos y aminoácidos de KETc1, KETc12 y GK-1 en los cuatro céstodos.



- Determinar si existen diferencias importantes en los péptidos homólogos respecto a los incluidos en la vacuna.
- Comparar las secuencias obtenidas con genomas de otros organismos con el fin de encontrar una probable función de los péptidos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

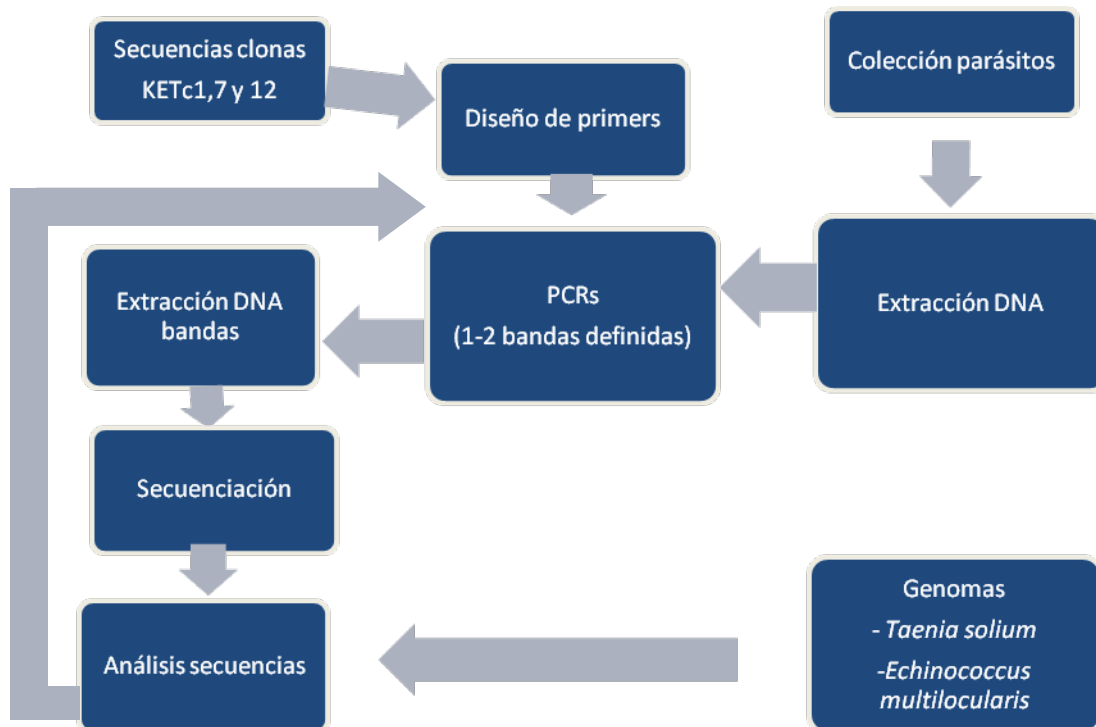
La estrategia general que se siguió para la identificación de las secuencias que codifican para los péptidos KETc1, KETc12 y GK-1, se muestra en la Figura 5.1. A partir de las secuencias de ADNc de las clonas que resultaron positivas en la inmunodetección, se diseñaron oligonucleótidos o cebadores de inicio y final para poder amplificar por PCR los péptidos. Los oligonucleótidos se probaron primero con ADN del parásito a partir del cual se sintetizaron. Si tras analizar los productos de amplificación por electroforesis se obtenía una o dos bandas bien definidas, se procedía a utilizar el mismo juego de cebadores para amplificar ADN de los otros parásitos. Las bandas obtenidas se extrajeron para recuperar el ADN y se enviaron a secuenciar con ambos oligonucleótidos. Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias de las clonas originales de *Taenia crassiceps* o las obtenidas anteriormente para determinar la homología. Asimismo se utilizaron herramientas informáticas para traducir las secuencias de nucleótidos a aminoácidos. La información de los genomas de *Taenia solium* (UNAM) y de *Echinococcus multilocularis*, se fue integrando al proyecto y, a partir de ésta, se diseñaron, en algunos casos, nuevos cebadores.

### 5.1. Colección de parásitos

Los parásitos a partir de los cuales se extrajo ADN fueron obtenidos de diferentes lugares. Se utilizaron cisticercos de la cepa ORF de *Taenia crassiceps*. Esta cepa se ha mantenido por pasaje seriado intraperitoneal en ratones hembra BALB/cAnN durante 16 años en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los parásitos con los que se infectaron ratones se

cultivaron a partir de la cavidad peritoneal de ratones infectados tras 1-3 meses de la inoculación intraperitoneal de 10 parásitos no gemantes de aproximadamente 2 mm por ratón (Fragoso *et al.*, 1998).

Figura 5.1: Estrategias empleadas en el proyecto



Los cisticercos de *Taenia solium* se extrajeron de músculo esquelético de cadáveres de cerdos provenientes de Morelos, Puebla o de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM infectados con este parásito. La disección se llevó a cabo de 2 a 4 horas después del sacrificio. Los cisticercos que no se usaron inmediatamente se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  o se refrigeraron a  $4^{\circ}\text{C}$  en etanol al 70% hasta ser utilizados. Las muestras de *Taenia saginata* se recolectaron en rastros de Brasil a partir de vacas infectadas de forma natural o a partir de muestras obtenidas en el estado de Guerrero. Para el primer caso, el ADN de cisticercos se

extrajo en Brasil y fue enviado al laboratorio. Los especímenes de *Echinococcus granulosus* se obtuvieron del hígado de cerdos infectados en rastros del estado de Puebla. Los quistes se aislaron del hígado y se almacenaron en etanol al 70% tras ser lavados con solución salina estéril o PBS 1X. Una vez en el laboratorio, los quistes se usaron inmediatamente o se almacenaron a -70°C.

Por otra parte, el ADN de *Echinococcus multilocularis* fue donado por el doctor Klaus Brehm de la Universidad de Würzburg en Alemania.

## 5.2. Extracción de ADN

Para aislar ADN de cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps*, así como de *E. granulosus*, se utilizó el kit Genomic Prep® de Amersham Biosciences (ahora GE®). En fechas más recientes, se utilizó un protocolo estándar<sup>2</sup> de extracción con fenol-cloroformo y posteriormente se aisló ADN con el kit DNeasy Tissue & Blood® de Qiagen®.

## 5.3. Diseño de oligonucleótidos

En la Figura 5.2 se muestran los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar exclusivamente las secuencias homólogas de las secuencias de los péptidos incluidos en la vacuna S3Pvac, KETc1, KETc12 y GK-1.

---

<sup>2</sup> DNA Preparation from Fresh/Frozen Tissue (2004), Section of Cancer Genomics, Genetics Branch, NCI, NIH. [www.riedlab.nci.nih.gov/publications/DNA%20Prep\\_Fresh-Froz%20Tiss.pdf](http://www.riedlab.nci.nih.gov/publications/DNA%20Prep_Fresh-Froz%20Tiss.pdf)

Figura 5.2: Oligonucleótidos empleados para la amplificación de secuencias homólogas de los tres péptidos.

A) KETc1

```

1 AGCTCAAATC CATCTCGGAT GAGCAGAAAC CGACGGTTGC CATCATAACA AACCTTTTAT
61 GCGAGAAGTT GGCAGTGGAC TCGCTGATTG AACGCAAAAC CACCTACATT AGATATGAGA
KETc1 →
121 CTAAGGGT [AG CTCCAACGTC TACACCATTG GCTACATCGG TTCGGTG]AAA GTGATCTCAG
        Péptido KETc1

181 TCAAGCTACC CATGGTCGGT TGGGAGCGTC AAGCGAAGAT ATCGTCCAGT GGCATCATCA
241 CCCGCCTTCT TGGTACATTT CAGACAATTC AGCACGTAAT TCTCTGCGGA GTGGTGGGAG
301 GCGGGTACCG CATGTCTATG AATTTAAGAA GCACTCCGCC TGGGCGACAT TGTAATCTCG
361 GCTCCGAGTG GTGGGAATTC ATGCATGCTT TGATGGGCTC CCAGCCTTGG TACATCTTCT
421 GCGAGCAGTT GACTACGTCA ACGGTAATGC TTCTCAAAT GCCAACGGGG AATACAGGCC
481 AGCAAAAGCA GCAGCAGGAG GTGGCTTTCA CGCATAAGAA ATTTTCCCA AAAAAATCCC
541 ATTCTGTTGA CGTTATGCAA GCCAAGGCTC TACTTGAAGC CGGTCCTACC TCTTGGCATC
        K1T3 →
601 CCATAATCCA AGAAGGAATG AATTTCCTCC AGGAACATGA ATTCCACTTC AATCGGCCGC
661 CGAGTGAGAC TGATAAGCTC AAAAATCAGA TTGGAGACGA GATGATTGTG GATGTGAAAC
721 ACCCTGAACC CCTGGGAGAG ATGCCGCCAC CGCCTCTAGT CCGCCTTGGG TGCAATGGAT
        ←
781 CCGSTCAIST AGTTACCCAG TGCCAAAGTT TTCGCGACCT CTTTGTGTC AATCAAATC
        K1b-AS
841 TGCTGGCTTA TGACACCGAG TTGATCAGG TGCTTGAATC CCTCTTGGGG AATGGAGTGG
901 GTTCCTTCTT CATTGTTCTG GGCATTGCGG ATTATGCTGA AGGCCGCCAA GGCATCGATG
961 CAGGAGCAGC CTCAACTAAT TGGCAACCCT ACTCCGGCCC TTAGTGCAGC TGCCATTTAC
1021 TCGACCACTT GTCCTTAAAT TGTCTGCAT GGACTTCGCC GAATCGCTTT GTTAATTTAA
1081 ATCAGTGTGC GTTGCTTCTT AGCCTGTTAT TTTATGAATA TAATTAACCG TTGCTTAATA
1141 TCACTTTCC CACATGTTGSA TCTTTGAATA ACCCC
        ←
        RK1

```

A partir de un BLAST se encontró que la secuencia EL740346 de *T. solium* (gris) se alinea por el extremo 5' con la secuencia del inserto correspondiente a KETc1 (negro).

| Nombre       | Dirección | Secuencia                 | Temperatura alineación Tm (°C) |
|--------------|-----------|---------------------------|--------------------------------|
| KETc1        | Inicio    | GCTCCAATTGTCTACACC        | 55                             |
| KETc1 (2294) | Inicio    | AGCAGAAACCGACGG           | 58                             |
| K1T3         | Inicio    | CTACTTGAAGCCGGTCTACCTTTGG | 74                             |
| K1b-AS       | Final     | GTA ACTACATGACCGGATCCAATG | 70                             |
| RK1          | Final     | GTTATTCAAAGATCGAACATGTG   | 62                             |

## B) KETc12

```

1 TAAAAGATGC CAATTTCAAG CGTCTTTTGG TTCATCTCAG GTGGTATCAG CACTCCAAGT
61 TCAACAATCA TOCACCBAATG AGCGTAAGAC ATGGCAGTAG CCAATCAGAT CAGAGTGTGG
   E. multi sense →
121 TAGAACAGAT TATA AAGCT GATGTCSTTG TCGTG AGACA TTACTCGCGG ATTGCAATG [G
KETc12 →
181 GCAACCTCTT ATTGAGTGT TTGTGA]AGGC CTCAACCGTA GATGCAGGCG ACAAGGGGCGC
   Péptido KETc12
241 ATGTCCCTAT TCTCAGAAGT GGTTTATGGT GTTCTAOCCTG TTTGTGGAGC GACACCTGAT
301 TAACTCCGA GTTATTCCCG TCTCTATGCC AATCCACCCG ATGATACAG TCGACTTGAC
   E. multi AS ←
361 ATGAATAAGC AATTGCCAGC CATCGCATTG TACAGTAATC CCAGTGACGA TTCAAATGTG
421 CGGCAAACCTC CAGACTTTGT GTATACTGGA GACGACGAAC TGGAGGAGTT CCTAAGTTTA
481 AGATACAGCT COGAGATGAA CGTTGATGCT GAAGAACAGT GGGTTGGAGC AGACCTACTA
541 CGAAGTCTCA ATCACTTCTT GCGTACAGGG TOCTATCAAC AGCTGCTAGC CAACCTCACC
601 GCCGTAATG ATCATCTACA AAATAAAAAA ACCAAATTCC TTGAGGGTAA TTACTTCACC
661 TACTCGGATT GCGCGCTTGC CAGCAAATTG CATCAOCTGC GTGTGCTGC GCCCTCTTC
721 CGCGGGCTCG GCATTCCGA CNACTTGAGC TACCTCTG GT CCTACCTAAA GGCTGTCTAT
   K12T3 →
781 GCCACGAGGG TGTTTGATAC CACTTGTCCG TTGGATOGTG ACATTCTGTT GCACTOCCTT
841 GAAAAGGTGG ACTTCGTCAG CCTTGAGGCC AGGAAAGAAG CTGACCATGA AATTATCATT
901 CTCCACAGG AGAACAGAG CACAGGCAGA CCAAGTGAAA ATCCAAAAGC CGCTGCTCAG
961 GTGCCACACC TCGTGTGTTT TGGGATAAGT CTCGTACTAC ACAGCATGAT GCCAAOCATG
   K12T7 ←
1021 GASTAGCA GASTAGCA AGTCGGCTG AGTCGTCTTT TTACGGCAGA GGAATAGGCA
1081 AAGGGAACAA AACAGCCCTT TTTTCTACC CCTCCTGCAA ACCAAGTCCT GAAAAAATT
1141 CCCATTAGCC CTTTCCCAAG TACACATGCA CACACAATCG CTCACTTGTT TTCATCCTGT
1201 TGCTATGSCA AACGCTTGAC ATTCCCTACAT TTGGTAITTT CATCGACTGA ATGCATTATC
   RK12 ←
1261 ACTTCTGTCT ACCAAAAAAA AAAAAAAA AACTCGAG

```

A partir de un BLAST dentro del genoma de *E. multilocularis* se encontró que el contig 203 se alinea con la secuencia del inserto correspondiente a KETc12 (negro). La secuencia del contig proveyó más información del extremo 5' (gris).

```

1  GGGCACCGAG AACTAACGC CTTTATTCCC AAATTTCCGG TAAGTTGCCA ACTTCTTCCG
61  ACGCATCTCA GCCTTATCAA TGAGATCGTC ATGAATAAGG CTCGCAGTAT GAATCATTTC
121 GGCAATAACA GCGATAGCGT GTTGAGCATC CGTAACAATG TTTCTCAGAT TTCTACCAAA
181 AAACTTAAGC GCAGGAATAC TGTTGCCTGA GTTGATTACT GAGTAGTCAT TGTGCCCATT
241 CGCACAAAGCT GCCATTAAAA ATACCAAAG TGGACGTAGC ATTTTCCCCT TGCCGCTAAA
301 TGCATAGTCA GTGATGGCTG TGATGCTGCG ACTGGGGGTC AAAAGGACGT TTTTGACATC
361 ATTGGGTATT CGTTTAAACAT CCGCCATAGC AAGCATTTCC ACATCTCTAG CGGCCCCAGT
      K12sol sense —————→
421 GCATTCCTTA GCAGCAGACA CACTGGCAG A [ GAGAATTG GTTCTCAGTT GTTTAGCAAC
      Péptido Homólogo de KETc12 ←
481 AATAGCA ] TGT CTTAAACCGG TTAGNTTGT TTCCAAAAGC TCGCCGCGTT ATTAGGGACA
      K12sol AS
541 CAGACATGAG TGCCCRACAT GCCACGGGTC CAGTAGGCCA

```

Fragmento de la secuencia *Full Length* WTSOC034\_N07 de *T. solium*.

| Nombre         | Dirección | Secuencia                    | Temperatura alineación Tm (°C) |
|----------------|-----------|------------------------------|--------------------------------|
| E. multi sense | Inicio    | AAGCTGATGTCGTTGTGCTG         | 52                             |
| E. multi AS    | Final     | CATGTCAAGTCGACTGTAC          | 49                             |
| KETc12         | Inicio    | GCAACCTCTTATTGAGTTG          | 68                             |
| K12T3          | Inicio    | CGACAACCTTGACGTACCTCTG       | 64                             |
| K12T7          | Final     | GTGCTACTCTGTCGTA             | 58                             |
| RK12           | Final     | CTGAAGTGATAATGCATTTCAGTCGATG | 76                             |
| K12sol sense   | Inicio    | ACACTGGCACGAGAGAATTTG        | 52                             |
| K12sol AS      | Final     | ATGTTGGGCACTCATGTCTGT        | 52                             |

C) KETc7 (GK-1)



A partir de un BLAST se encontró que la secuencia EL745878 de *T. solium* (gris) proveía más información sobre el extremo 5' y que, en general, se alinea con un 88% de similitud con la secuencia del inserto correspondiente a KETc7 (negro).

| Nombre          | Dirección | Secuencia                      | Temperatura alineación Tm (°C) |
|-----------------|-----------|--------------------------------|--------------------------------|
| KETc7 sense     | Inicio    | GCATTTATGCAGCCGCATCCTTC        | 69                             |
| Sense primer    | Inicio    | GCATTTATGCAGCCGCATCCTTCC       | 74                             |
| A04             | Inicio    | GAATTCGGCACGATTTATGCAGCCGCAT   | 79                             |
| GSK7            | Inicio    | GCAATTAACAGCCACGTTTGG          | 55                             |
| KETc7 antisense | Final     | TACCTTGGTCTTCTATTCTTCTTAGAAATC | 60                             |
| A05             | Final     | CTAAAGATTCTTCTTATCTTCTGGTTCCAT | 74                             |



Para amplificar los tres péptidos se partió de las secuencias de los insertos de las clonas correspondientes. Conforme avanzó el proyecto se incorporaron más secuencias, principalmente de GenBank, para diseñar nuevos oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular o el Instituto de Biotecnología de la UNAM. En otros casos fueron sintetizados por Invitrogen®.

#### 5.4. Controles positivos y estandarización

Como controles positivos se usó ADNc de los insertos de las clonas originales de los tres péptidos obtenidos en la biblioteca de *Taenia crassiceps*, subclonadas en los plásmidos pSK (KETc1 y KETc12) o PUI (KETc7). El inserto de KETc1 abarca 1059 pb que corresponde al segmento intermedio del gen. KETc12 y KETc7 corresponden al extremo 3' de sus respectivos genes ya que incluyen la cola de poli(A). El inserto del primero incluye 1133 pb, mientras que el segundo comprende 445 pb. Las reacciones se estandarizaron inicialmente con estos ADNc o ADN de *T. crassiceps* si el cebador se diseñó a partir de las secuencias de los insertos; o con ADN del parásito a partir del cual se diseñaron los oligonucleótidos.

### 5.5. Amplificación de secuencias homólogas por PCR

Todas las reacciones de PCR empleadas en este trabajo se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad para evitar contaminación. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 50  $\mu$ l. Para cada reacción se emplearon 5  $\mu$ l de Buffer de PCR 10X (200 mM Tris HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 1.7  $\mu$ l de cloruro de magnesio 50 mM y 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM. Los tres reactivos anteriores fueron de Invitrogen®. Asimismo se empleó 1  $\mu$ l de oligonucleótido de inicio y de final, cada uno en una concentración de 20 ng/  $\mu$ l y 0.5  $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen®). A cada reacción se le adicionaron 500 ng de ADN, y el volumen restante se completó con agua grado biología molecular (Gibco®). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Palm Cycler® (Corbett Life Science®, Sydney, Australia) o en un equipo modelo PTC-1000 de MJ Research® (Waltham, MA, EUA). Ambos se programaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 1 minuto en la temperatura de alineación y un minuto a 72°C. Se incluyó además un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

### 5.6. Electroforesis

Los productos obtenidos durante los PCRs se corrieron en geles de agarosa preparados con TAE 1X y se visualizaron usando luz ultravioleta mediante tinción con bromuro de etidio o SYBR Safe (Invitrogen®). Para productos pequeños, menores a 200 pb, se utilizaron geles al 2%, mientras que para los demás se utilizaron geles al 1%. Los geles se corrieron a 85V durante

45 minutos. Las bandas se compararon con los marcadores de peso molecular VIII y XIV (100 en 100 pares de bases) de Roche®.

#### 5.7. Purificación de bandas

Las bandas que se obtuvieron dentro del rango de tamaño (pares de bases) esperado, se purificaron por medio del kit QIAEX II® de Qiagen®. El producto se resuspendió en 20 µl de agua (grado biología molecular, Gibco®), se cuantificaron y se enviaron a secuenciar junto con sus correspondientes oligonucleótidos de inicio y de reversa (10 pmol/µl cada uno).

#### 5.8. Secuenciación

Las muestras se enviaron para su secuenciación al Instituto de Investigaciones Biomédicas o al Instituto de Biotecnología, ambos de la UNAM. En la primera unidad se secuenciaron las muestras en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE® (Applied Biosystems®)<sup>3</sup>. En la segunda se utilizó un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems® Modelo 3730<sup>4</sup>. Los resultados, en forma de electroferograma, se visualizaron y analizaron con el programa Chromas Lite® versión 2.01, disponible de forma gratuita en el Internet<sup>5</sup>.

---

<sup>3</sup> <http://www.biomedicas.unam.mx/Servicios.htm>

<sup>4</sup> <http://www.ibt.unam.mx/sintesis/secuenciacion.html>

<sup>5</sup> [http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)

## 5.9. Análisis de Secuencias

Las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias de los insertos de clonas originales de *Taenia crassiceps* para determinar su homología utilizando varias aplicaciones. Blastn para alinear dos secuencias<sup>6</sup> fue la más usada. Cuando no se obtuvieron alineaciones satisfactorias, se recurrió también a SimAlign<sup>7</sup>, ClustalW<sup>8</sup> o T-coffee<sup>9</sup>; estos dos últimos fueron utilizados especialmente para la alineación de varias secuencias de manera simultánea.

Para hacer la traducción de las secuencias de nucleótidos a aminoácidos, se utilizó la aplicación Translate Tool de Expasy<sup>10</sup>.

De forma adicional, todas las secuencias obtenidas fueron analizadas por BLAST de nucleótidos (blastn). La búsqueda se realizó dentro de los marcadores de secuencia expresada (ESTs) pertenecientes a organismos diferentes de humanos y ratones (base de datos est\_others). Esta búsqueda se llevó a cabo con el objetivo de determinar la probable función, por homología, de cada uno de los péptidos.

---

<sup>6</sup> [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROG\\_DEF=blastn&BLAST\\_PROG\\_DEF=megaBlast&SHOW\\_DEFAULTS=on&BLAST\\_SPEC=blast2seq&LINK\\_LOC=align2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq)

<sup>7</sup> <http://ca.expasy.org/tools/sim-prot.html>

<sup>8</sup> <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

<sup>9</sup> <http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi?stage1=1&daction=TCOFFEE::Regular&referer0=embnet>

<sup>10</sup> <http://ca.expasy.org/tools/dna.html>

## 5.10. Genomas

Para el diseño de nuevos cebadores y la comparación de secuencias, se utilizó información del genoma de *Taenia solium* (Proyecto IMPULSA 3, UNAM), principalmente en forma de secuencias reportadas en Genbank<sup>11</sup> (NCBI), pero también datos sin reportar del proyecto del genoma. Asimismo, se utilizaron secuencias del genoma de *Echinococcus multilocularis*. Las secuencias están abiertas al público en la página de Internet del Instituto Sanger<sup>12</sup>.

---

<sup>11</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

<sup>12</sup> <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Echinococcus/>

## 6. RESULTADOS

### 6.1. KETc1

En la Tabla 1 se ilustran las diferentes combinaciones de oligonucleótidos utilizadas para amplificar la secuencia del péptido KETc1 en los diferentes céstodos.

**Tabla 1: Combinaciones de oligonucleótidos para amplificar la región homóloga de KETc1.**

| Combinación oligonucleótidos | Tamaño esperado banda (pb) | Notas                     |
|------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| KETc1-RK1                    | 1043                       |                           |
| KETc1-K1b-AS                 | 655                        |                           |
| K1T3-RK1                     | 603                        | No incluye región péptido |
| K1T3-K1b-AS                  | 177                        | No incluye región péptido |
| KETc1 (2294)-K1b-AS          | 787                        |                           |

Dentro de la primera etapa, se descartaron las combinaciones K1T3-RK1 y K1T3-K1b-AS, ya que no abarcaban la región que codifica al péptido KETc1. Esto último se debe a que el oligonucleótido K1T3 (inicio) se encuentra río abajo de la secuencia que codifica al péptido, como se puede observar en la Figura 5.2. Las dos primeras combinaciones generaron los productos de amplificación esperados utilizando el ADN del plásmido PSK con el inserto de la clona KETc1. No obstante, por la alta temperatura de alineación que requería la combinación KETc1-RK1 y por producir amplificadas de varios tamaños, es decir, más de dos bandas al visualizar los productos en un gel, se seleccionó para continuar los estudios la combinación KETc1- K1b-AS.

KETc1-K1b-AS se utilizó para amplificar el ADN de todos los parásitos a una temperatura de alineación de 52°C, obteniendo un producto de alrededor de 700 pb y otro de cerca de 1000 pb. Al secuenciar las bandas se observó que ambas contenían secuencias homólogas de la clona KETc1. Se observó también que por el hecho de que el cebador KETc1 se sobrepone a la región que

codifica al péptido, las secuencias obtenidas no incluían por completo al péptido. Éstas se analizaron posteriormente por medio de la herramienta BLAST. Los resultados generaron secuencias altamente homólogas (95-100%) provenientes del proyecto del genoma de *Taenia solium* que extendían hacia el extremo 5' la secuencia conocida de KETc1. De entre ellas, la secuencia reportada con el número EL740346 (larva) en GenBank se utilizó para diseñar un nuevo oligonucleótido de inicio, KETc1 (2294), que abarcara toda la secuencia del péptido. Además, se encontró una secuencia de *E. granulosus* que se alineó con una homología de 83%, también al extremo 5' de KETc1. Esta secuencia está reportada bajo la clave BQ173809 y nos permitió predecir si el nuevo oligonucleótido podría servir para amplificar en especies de este género. Se encontró que de las 15 bases que componen al cebador, existe solamente un cambio en esta secuencia reportada para *E. granulosus* (93% homología), diferencia que no representaba inconvenientes para lograr amplificaciones eficientes. El tamaño esperado de la banda usando este cebador, en conjunto con K1b-AS, se calculó en 787 pb.

Por otra parte, se encontró una secuencia de *E. multilocularis* con un 89% de homología respecto a la secuencia de *T. crassiceps*. La secuencia es parte del contig 6325 y se encuentra reportada en la página del Instituto Sanger. Una alineación adicional con los oligonucleótidos indicó que mientras la secuencia del cebador de inicio estaba conservada en este contig, no era así para el final (K1b-AS), pues no coinciden los nucleótidos en los extremos del mismo. Esto sugirió que muy probablemente no se podría amplificar ADN de *E. multilocularis* con estos oligonucleótidos.

En la Figura 6.1 se muestran los productos de amplificación de KETc1 mediante PCR. A pesar de que se utilizaron 500 nanogramos de ADN de acuerdo a las cuantificaciones que se realizaron usando un equipo Nanodrop, en los carriles 5 y 6, que pertenecen a *T. saginata* y *E. granulosus*,

respectivamente, las bandas se ven más tenues. *E. multilocularis* no se pudo amplificar debido a que era necesario diseñar un nuevo oligonucleótido final y no se contaba con ADN suficiente para el experimento.

Figura 6.1: Amplificación de secuencias homólogas de KETc1 por PCR.

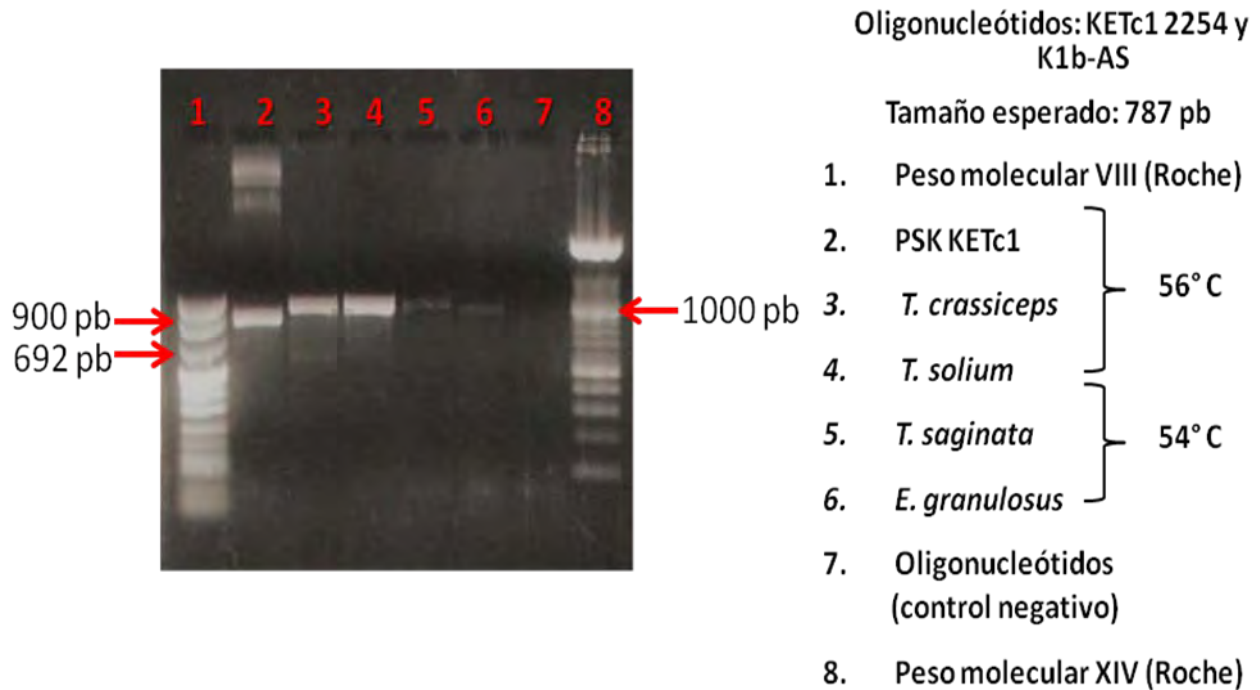


Tabla 2: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidos al secuenciar los productos de PCR de KETc1.

| Especie                  | Secuencias |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |             |
|--------------------------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|
| <i>T. crassiceps</i>     | AGC<br>A   | TCC<br>P | AAT<br>M | GTC<br>S | TAC<br>T | ACC<br>P | ATC<br>S | GGC<br>A | TAC<br>T | ATC<br>S | GGT<br>V | TCG<br>R | GTG<br>Stop |
| <i>T. solium</i>         | GAC<br>T   | TCC<br>P | AAC<br>T | GTC<br>S | TAC<br>T | ACC<br>P | ATT<br>L | GGC<br>A | TAC<br>T | ATC<br>S | GGT<br>V | TCG<br>R | GTA<br>Stop |
| <i>T. saginata</i>       | GAC<br>T   | TCC<br>P | AAC<br>T | GTC<br>S | TAC<br>T | ACC<br>P | ATT<br>L | GGC<br>A | TAC<br>T | ATT<br>L | GGC<br>A | TCG<br>R | GTG<br>Stop |
| <i>E. multilocularis</i> | GAC<br>T   | TCC<br>P | AAC<br>T | GTC<br>S | TAC<br>T | ACC<br>P | ATC<br>S | GGC<br>A | TAT<br>I | ATC<br>S | GGT<br>V | TCA<br>Q | GTA<br>Stop |
| <i>E. granulosus</i>     | GAC<br>T   | TCC<br>P | AAC<br>T | GTC<br>S | TAC<br>T | ACC<br>P | ATC<br>S | GGC<br>A | TAT<br>I | ATC<br>S | GGT<br>V | TCA<br>Q | GTG<br>Stop |



En el gel, se aprecian bandas menos claras, de alrededor de 700 pb, y otras más claras, de aproximadamente 1000 pares de bases. Es oportuno mencionar que estos experimentos se realizaron usando ADN genómico, el cual puede contener intrones, a diferencia del ADN complementario o ADNc. Los tamaños de bandas esperados se calcularon con base en secuencias de este último.

Los resultados de la secuenciación de las bandas y la región homóloga de *E. multilocularis* que se encontraron al hacer un BLAST, se muestran en la Tabla 2. A pesar de los cambios entre especies, KETc1 parece retener su característica de ser un péptido rico en prolinas y serinas. Cinco de sus doce aminoácidos se encuentran conservados entre especies, además del codón de paro. Estos aminoácidos podrían desempeñar roles interesantes durante su presentación como antígeno. Las diferencias en aminoácidos observadas no parecen modificar la hidrofobicidad/hidrofilicidad del péptido.

## 6.2. KETc12

Para la identificación de las secuencias de KETc12 en los distintos céstodos se utilizó una estrategia similar a la empleada para identificar la secuencia de KETc1. A partir de los oligonucleótidos sintetizados (Figura 5.2) se diseñaron combinaciones diferentes para lograr amplificar la región correspondiente a KETc12 en *T. crassiceps* y el resto de los parásitos. Estas combinaciones se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3: Combinaciones de oligonucleótidos contemplados para amplificar KETc12.**

| Combinación oligonucleótidos | Tamaño esperado banda (pb) | Notas                           |
|------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| KETc12-RK12                  | 1091                       |                                 |
| KETc12-K12T7                 | 860                        |                                 |
| K12T3-RK12                   | 585                        | No incluye región péptido       |
| K12T3-K12T7                  | 304                        | No incluye región péptido       |
| K12Tsol sense - K12Tsol AS   | 152                        | Biblioteca <i>Full Lengths</i>  |
| E. multi sense-E.multi AS    | 230                        | Genoma <i>E. multilocularis</i> |

En la primera fase, las combinaciones K12T3-RK12 y K12T3-K12T7 se descartaron por no amplificar la región que se pretendía caracterizar (figura 5.2). Las dos combinaciones restantes amplificaron de manera satisfactoria la región homóloga de KETc12 en *T. crassiceps*, *T. solium* y el control positivo (KETc12 pSK). El PCR con ambas combinaciones de oligonucleótidos KETc12-RK12 y KETc12-K12T7 se llevó a cabo a una temperatura de alineación de 50°C. Desafortunadamente, la primera de estas combinaciones no produjo ampliificaciones al usar ADN de *T. saginata*. Además, por amplificar una región de un tamaño menor con KETc12-K12T7, era más probable que se pudiera secuenciar el producto completo que si se hubiera obtenido uno de 1091 pares de bases.

Las secuenciaciones no resultaron de utilidad para determinar la homología de la región que codifica al péptido de ocho aminoácidos. Esto se debió a que el oligonucleótido de inicio KETc12 se diseñó justamente a partir de la región que codifica al péptido, pues tampoco se contaba con más secuencia hacia el extremo 5'. Los fragmentos amplificados no llegaron a abarcar más de tres aminoácidos del péptido. Al contrario de lo observado para KETc1, al hacer un BLAST con esta secuencia no se encontraron secuencias reportadas de *Taenia* o *Echinococcus* que nos proporcionaran más información del extremo 5' para diseñar nuevos oligonucleótidos. Sin

embargo, las secuencias con número EL744189 (larva), EL743936 (larva) y EL741351 (larva) de *T. solium* reportadas en GenBank, se utilizaron para confirmar la secuencia del gen donde se encuentra el péptido.

Debido a los resultados anteriores, se recurrió a dos estrategias para obtener nuevas secuencias que nos permitieran amplificar y comparar la región homóloga de KETc12 en los parásitos restantes. La primera de ellas consistió en buscar secuencias altamente homólogas por medio de un BLAST de una biblioteca de *Full Lengths* (FL)<sup>13</sup> generada como parte del proyecto del genoma de *T. solium*. Puesto que no se encontraron homologías usando secuencias de nucleótidos, se realizó una búsqueda con las secuencias de aminoácidos de los péptidos. Dentro de esta última se encontró una secuencia muy parecida a la de KETc12 dentro de los contigs secuenciados hasta la fecha:

```
>WTSOC034_N07.cap.contigs  
  Length = 73
```

```
Score = 16.9 bits (32), Expect = 8.6  
Identities = 6/7 (85%), Positives = 7/7 (100%)
```

```
Query: 2 NLLLSCL 8 -----> Secuencia original de KETc12  
      NL+LSCL  
Sbjct: 48 NLVLSCL 54
```

A partir de esta secuencia homóloga para KETc12, se diseñaron los oligonucleótidos K12Tsol sense y K12Tsol AS para amplificar esta región usando ADN de los parásitos. Se calculó que se debería obtener una banda de 152 pares de bases. Inicialmente se probó en *T. solium* y, tras determinar que la temperatura óptima de alineación era de 56°C, se procedió a hacer los PCRs en

---

<sup>13</sup> Una secuencia *Full Length* incluye el ADNc desde el sitio del casquete o cap en 5' hasta el sitio de adición de la cola Poli (A) en 3'. (Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto Salk: <http://signal.salk.edu/cabout.html>)

los otros cuatro céstodos. No obstante, sólo amplificó *T. saginata*. Por una alineación con el genoma de *E. multilocularis* usando la secuencia de donde se diseñaron los oligonucleótidos, se observó que muy probablemente no se estaba pegando el cebador final en el ADN de *E. multilocularis* y *E. granulosus*, pues aunque la secuencia se parece bastante (alrededor de 82%), está truncada 15 aminoácidos antes del sitio dónde se debería pegar éste. Posteriormente se realizó una alineación de nucleótidos en la cual se observó que aunque la secuencia del péptido es básicamente la misma, el contexto dentro del cual se encuentra la secuencia obtenida de las *Full Lengths* no tiene ninguna similitud con la secuencia original de la clona de KETc12. Esto podría indicar que la región que se está amplificando pertenece a otra proteína no relacionada que sólo tiene en común el tener conservada la secuencia del péptido.

La segunda estrategia consistió en buscar secuencias homólogas a las de la clona KETc12 dentro del genoma de *E. multilocularis*. Al alinear la secuencia de KETc12 en la interfaz de BLAST utilizando la página del genoma, se obtuvo una secuencia con 77% de homología en el contig número 203, y que a primera vista coincidía con KETc12. Además, este contig extendió la secuencia conocida de KETc12 hacia el extremo 5'. Al hacer la traducción de nucleótidos a aminoácidos se encontró lo siguiente:

*E. multilocularis*:        S L L L S Y L **Stop**  
*T. crassiceps* (clona) : N L L L S C L **Stop**

Debido a que esta nueva secuencia sí parece corresponder a KETc12, se realizó un análisis en BLAST con el contig 203 para identificar si existían secuencias de *T. solium* reportadas en GenBank que nos proveyeran información. Se encontró que una de ellas, con la clave EL743930 (larva), tiene

un 80% de homología en relación al contig de *E. multilocularis*. Desgraciadamente, esta secuencia comienza en el tercer aminoácido de la secuencia que codifica al péptido KETc12. Al alinear los péptidos traducidos de las diferentes secuencias se obtuvo:

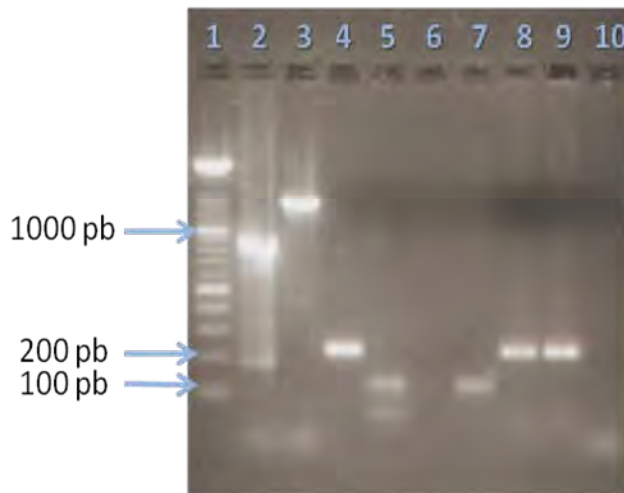
*E. multilocularis*: S L L L S Y L **Stop**  
*T. crassiceps* (clona): N L L L S C L **Stop**  
*T. solium* (GenBank): - L L **Stop** S C L **Stop**

A nivel de nucleótidos, no hay gran diferencia, pero llaman la atención dos cambios de base separados por otra base conservada, que modifican el codón TTG (Leucina) a TAG (Stop) en *T. solium*:

*E. multilocularis*: GCCTCTT**GTT**GAGTT**A**TTTGTGAAG  
*T. solium*: GCCTCTT**A**T**A**GAGTT**G**TTTGTGAAG

Se sintetizaron dos oligonucleótidos a partir del contig 203, que se denominaron E.multi sense y E.multi AS, para amplificar la región homóloga a KETc12 y confirmar las secuencias reportadas. El cebador de inicio se escogió aleatoriamente y el final se escogió tomando en cuenta que la secuencia de nucleótidos se conservara en *T. crassiceps* y *T. solium*. Al hacer el PCR con ADN de *E. multilocularis*, se observó una amplificación a 55°C y una banda bien definida correspondiente al peso esperado de 230 pares de bases. La secuenciación dio una homología de 99% con las secuencias del genoma de *E. multilocularis*. Además, se pudo amplificar también con este juego de oligonucleótidos ADN de *E. granulosus* y *T. solium*. La secuenciación de la banda de *T. solium* confirmó la presencia del codón de término (stop) a la mitad de la secuencia del péptido homólogo. *T. saginata* no se pudo amplificar con estos cebadores, probablemente debido a que la secuencia del cebador de inicio difiere de la del parásito. La secuencia del cebador de reversa (E.

Figura 6.2: Resultados de la amplificación de regiones homólogas de KETc12 en los diferentes céstodos.



|    | ADN                                | Oligonucleótidos   | Tamaño esperado (pb) | Tm (°C) |
|----|------------------------------------|--|----------------------|---------|
| 1  | Peso molecular XIV (Roche)         | -----  | ---                  | ---     |
| 2  | Plásmido (PSK KETc12)              | KETc12-KETc12T7 y E.multi AS                             | 230 y 860            | 53      |
| 3  | <i>Taenia crassiceps</i>           | KETc12-KETc12T7  | 860                  | 50      |
| 4  | <i>Taenia solium</i>               | E.Multi sense-AS   | 230                  | 55      |
| 5  | <i>Taenia solium</i>               | K12Tsol sense-AS   | 150                  | 56      |
| 6  | <i>Taenia saginata</i>             | E.Multi sense-AS   | 230                  | 55      |
| 7  | <i>Taenia saginata</i>             | K12Tsol sense-AS   | 150                  | 56      |
| 8  | <i>Echinococcus multilocularis</i> | E.Multi sense-AS   | 230                  | 55      |
| 9  | <i>Echinococcus granulosus</i>     | E.Multi sense-AS   | 230                  | 55      |
| 10 | Control negativo                   | KETc12, KETc12T7, E.multi sense y AS; K12Tsol sense y AS | ---                  | 53°C    |

Tabla 4: Secuencias homólogas de nucleótidos y aminoácidos halladas en KETc12.

| Especie                  | Secuencias |          |          |          |             |          |          |          |             |
|--------------------------|------------|----------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|-------------|
| <i>T. crassiceps</i>     | GGC<br>G   | AAC<br>N | CTC<br>L | TTA<br>L | TTG<br>L    | AGT<br>S | TGT<br>C | TTG<br>L | TGA<br>Stop |
| <i>T. solium</i>         | AGC<br>S   | AGC<br>S | CTC<br>L | TTA<br>L | TAG<br>Stop | AGT<br>S | TGT<br>C | TTG<br>L | TGA<br>Stop |
| <i>E. multilocularis</i> | AGC<br>S   | AGC<br>S | CTC<br>L | TTG<br>L | TTG<br>L    | AGT<br>S | TAT<br>Y | TTG<br>L | TGA<br>Stop |
| <i>E. granulosus</i>     | AGC<br>S   | AGC<br>S | CTC<br>L | TTG<br>L | TTG<br>L    | AGT<br>S | TAT<br>Y | TTG<br>L | TGA<br>Stop |
| <i>T. solium FL</i>      | GAG<br>E   | AAT<br>N | TTG<br>L | GTT<br>V | CTC<br>L    | AGT<br>S | TGT<br>C | TTA<br>L | GCA<br>A    |
| <i>T. saginata FL</i>    | GAG<br>E   | AAT<br>N | TTG<br>L | GTT<br>V | CTC<br>L    | AGT<br>S | TGT<br>C | TTA<br>L | GCG<br>A    |

multi AS) se alineó perfectamente, sin cambios de bases, en secuencias que se habían obtenido anteriormente al amplificar con los oligonucleótidos KETc12-KETc12T7.

Utilizando las diferentes aproximaciones, se han logrado los resultados mostrados en la Figura 6.2 al amplificar por PCR.

Las secuencias, de la región homóloga al péptido KETc12, que se obtuvieron al secuenciar los fragmentos de ADN de las bandas y sus correspondientes traducciones a secuencias de aminoácidos, se encuentran en la Tabla 4. Tres de las cuatro leucinas del péptido y una serina se mantienen en todos los céstodos que se estudiaron.

### 6.3 KETc7 (GK-1)

A partir de la secuencia de nucleótidos reportada en el artículo de Manoutcharian *et al.* (1996) y de las secuencias con número U30899 y U31524 de GenBank, se diseñaron cinco oligonucleótidos: A04 sense, A05 antisense, Sense primer, Sense KETc7 y KETc7 antisense. Tal como se puede apreciar en la Figura 5.2, el hecho de que el péptido no se encuentra en el extremo 5' de la secuencia del inserto permitió diseñar cebadores de inicio y final. Además, tras una búsqueda en fragmentos del genoma de *T. solium*, se encontró que uno de ellos, denominado data 2\_704<sup>14</sup>, de alrededor de 770 pares de bases, se alineaba con una alta homología con KETc7 y proveía más información del extremo 5' del gen. A partir de aquí se diseñó un sexto oligonucleótido denominado GSK7 (inicio). Con los seis cebadores se plantearon las combinaciones de la Tabla 5 para lograr amplificar la región homóloga de este péptido en los distintos céstodos.

---

<sup>14</sup> Una parte de este fragmento se encuentra ahora reportada como la secuencia EL745878 de GenBank.

**Tabla 5: Diseños de PCR para amplificar KETc7.**

| Combinación oligonucleótidos  | Tamaño esperado banda (pb) |
|-------------------------------|----------------------------|
| GSK7-A05                      | 505                        |
| A04-A05                       | 240                        |
| Sense primer-A05              | 241                        |
| GSK7-KETc7 antisense          | 506                        |
| A04- KETc7 antisense          | 246                        |
| Sense primer- KETc7 antisense | 240                        |
| KETc7 sense-A05               | 224                        |
| KETc7 sense- KETc7 antisense  | 240                        |

Como se podrá notar, muchas de las combinaciones generan productos de 240 pares de bases. Esto se debe a que algunos de los oligonucleótidos se diseñaron a partir de la misma región de la secuencia de la clona o tienen sólo algunas variaciones de nucleótidos en los extremos. Todas las combinaciones se probaron inicialmente con una temperatura de alineación de 50°C. Al correr los productos en un gel, se observó que se generaban más de dos bandas y no siempre se obtenía amplificación con el control positivo (KETc7 PUI) o con ADN de *T. crassiceps* (de dónde se originaron las secuencias de los oligonucleótidos). Así, se seleccionaron las combinaciones GSK7-KETc7 antisense, GSK7-A05, Sense primer-KETc7 antisense y Sense-A05, donde ambos controles positivos amplificaron consistentemente en diferentes experimentos. Estas combinaciones se probaron con gradientes de temperatura (52, 54, 56 y 58°C). Sense-A05 y KETc7 sense-A05 se eligieron, ya que siempre se obtuvieron, incluso con la variación de la temperatura de alineación, dos productos visibles mediante electroforesis: uno de aproximadamente 600 pb y otro de alrededor de 250 pb (que corresponde al tamaño esperado).

Se eligió una temperatura de 52°C para amplificar el ADN de *T. solium* y *T. saginata*, obteniendo de igual manera ambos productos. Las bandas se cortaron, se purificaron y los productos se



secuenciaron. Durante la alineación del fragmento secuenciado de ADN genómico con secuencias de ADNc, se encontró que existen 906 pares de bases intermedios en el ADN genómico que interrumpen los fragmentos comunes a ambas secuencias. Esta secuencia intermedia se podría pensar que es un intrón y se ubica 21 pb río arriba del inicio de GK-1. Las secuencias en el extremo 5' y 3' de este fragmento no coinciden con las secuencias que hay reportadas hasta el momento como sitios de splicing en *Taenia spp.* (Vargas Parada, 2002). Para este análisis se usaron las secuencias reportadas de KETc7 en *T. crassiceps*, además de las secuencias EL745878 (larva) de *T. solium*.

Posteriormente se llevó a cabo el PCR con los oligonucleótidos KETc7 sense y A05 usando ADN de *E. granulosus*. La temperatura de alineación se modificó a 60°C. Los resultados de las amplificaciones del ADN de los diferentes parásitos se muestran en la Figura 6.3. Todos los productos se mandaron a secuenciar y se obtuvieron las secuencias homólogas de KETc7 que se reportan en la Tabla 6. En ella se puede observar que GK-1 es un péptido rico en tirosinas y prolinas. De los tres péptidos en la vacuna S3Pvac, es fácil darse cuenta que éste es el péptido más conservado entre las diferentes especies estudiadas. A excepción de la variación en el aminoácido del extremo amino de GK-1, glicina o alanina, el resto del péptido no presenta variaciones.

*E. multilocularis* no se amplificó por PCR. El dato reportado se hizo a partir de una alineación con las secuencias reportadas de su genoma. Se encontró que el contig 11155 tiene una homología del 87% con la secuencia de KETc7 en *T. solium*. La región del péptido parece estar conservada como se detalla en la Tabla 6. La amplificación de la secuencia homóloga de este parásito no se pudo llevar a cabo por falta del ADN, pero se planea llevar a cabo en el futuro. Un vistazo preliminar, al alinear los oligonucleótidos con la secuencia del contig 11155 indica que de hacerse el PCR quizás

se tendría que sustituir el cebador de inicio, pues sólo los 10 nucleótidos centrales del oligonucleótido se alinean.

Figura 6.3: Amplificación de regiones homólogas en GK-1(KETc7).

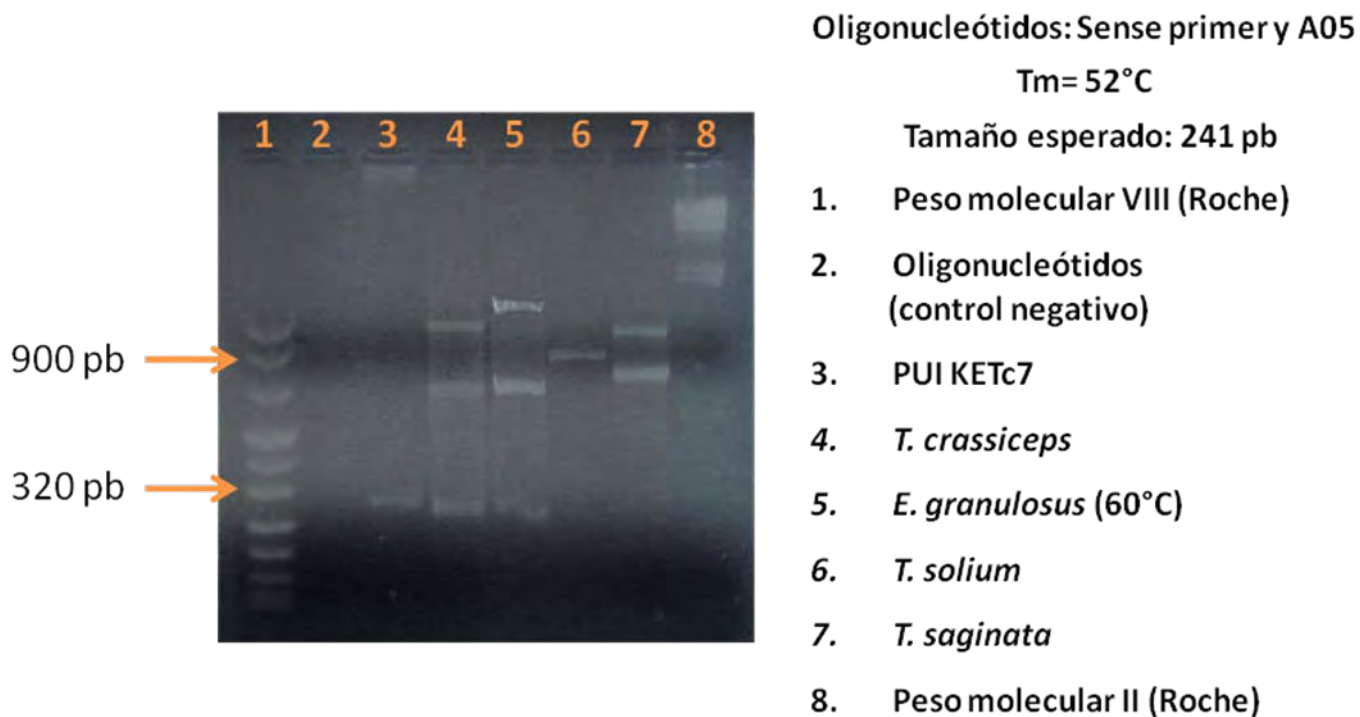


Tabla 6: Resultados de la secuenciación de regiones homólogas amplificadas de GK-1.

| Especie                  | Secuencias |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|--------------------------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <i>T. crassiceps</i>     | GGT<br>G   | TAT<br>Y | TAC<br>Y | TAT<br>Y | CCA<br>P | TCT<br>S | GAT<br>D | CCA<br>P | AAT<br>N | ACC<br>T | TTC<br>F | TAC<br>Y | GCT<br>A | CCA<br>P | CCC<br>P | TAC<br>Y | AGC<br>S |
| <i>T. solium</i>         | GCG<br>A   | TAT<br>Y | TAC<br>Y | TAT<br>Y | CCA<br>P | TCT<br>S | GAT<br>D | CCC<br>P | AAC<br>N | ACC<br>T | TTC<br>F | TAC<br>Y | GCT<br>A | CCA<br>P | CCC<br>P | TAC<br>Y | AGT<br>S |
| <i>T. saginata</i>       | GCC<br>A   | TAT<br>Y | TAC<br>Y | TAT<br>Y | CCA<br>P | TCT<br>S | GAT<br>D | CCC<br>P | AAT<br>N | ACC<br>T | TTC<br>F | TAC<br>Y | GCT<br>A | CCA<br>P | CCC<br>P | TAC<br>Y | AGT<br>S |
| <i>E. multilocularis</i> | GGG<br>G   | TAT<br>Y | TAC<br>Y | TAT<br>Y | CCA<br>P | TCT<br>S | GAT<br>D | CCC<br>P | AAT<br>N | ACC<br>T | TTC<br>F | TAC<br>Y | GCT<br>A | CCA<br>P | CCC<br>P | TAC<br>Y | AGT<br>S |
| <i>E. granulosus</i>     | GCG<br>A   | TAT<br>Y | TAC<br>Y | TAT<br>Y | CCA<br>P | TCT<br>S | GAT<br>D | CCC<br>P | AAT<br>N | ACC<br>T | TTC<br>F | TAC<br>Y | GCC<br>A | CCG<br>P | CCC<br>P | TAC<br>Y | AGC<br>S |

Como se observa en la Tabla 6, el péptido GK-1 presentó identidad en 17 de los 18 aminoácidos que lo constituyen, encontrando sólo en un aminoácido una sustitución de adenina por glicina que probablemente no representa una modificación sustantiva para su estructura o antigenicidad.

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis documentamos que existen regiones homólogas a los péptidos KETc1, KETc12 y GK-1 en diferentes céstodos, información que resulta esencial para el diseño de vacunas contra los mismos.

Adicionalmente, durante la realización de este proyecto han surgido observaciones que ameritan las siguientes consideraciones. Tras los diferentes análisis de secuencias se puede observar, con los datos reportados hasta la fecha, que los tres péptidos no son redundantes en la naturaleza. Sus secuencias no se encuentran repetidas en diferentes genes de *T. solium* y *E. multilocularis*. Del mismo modo, no se encontraron secuencias de nucleótidos, ni de aminoácidos similares en otros organismos, a excepción de algunos aminoácidos de KETc1. Como epítomos de una vacuna, el hecho de que se hayan seleccionado estos péptidos únicos los provee de un mayor grado de especificidad.

Se observó también que los tres péptidos incluidos en la vacuna S3Pvac se encuentran truncados, como se suponía, con respecto a sus secuencias originales en los parásitos. Es decir, que los péptidos que están en la vacuna son parte de péptidos de mayor longitud. KETc1, por ejemplo, tiene 15 aminoácidos más hacia el extremo amino dentro del mismo marco de lectura en *T. solium* y 13 en *E. granulosus*. Esto, a diferencia de otros estudios de identificación de candidatos para vacunación por inmunodetección, como el de Nisbet y colaboradores (2008), en donde seleccionan marcos de lectura completos (de metionina a stop). La elección de marco de lectura para este proyecto se hizo en base a aquel que incluyera la secuencia adaptadora de *EcoRI* que se usó como enzima de restricción al aislar los insertos. A partir de esos marcos de lectura se seleccionaron los

epítopes protectores sin atender a que se trataran o no de péptidos completos. En el caso de KETc7, los epítopes se identificaron con ayuda de un programa de cómputo, encontrando tres regiones con potencial antigénico y que posteriormente se probaron *in vivo* (Gevorkian *et al.*, 1996). Sin embargo, KETc1 y KETc12 se seleccionaron por ser el primer péptido dentro del marco de lectura, sin tomar en cuenta la antigenicidad de sus secuencias. A pesar de que no se analizaron los demás péptidos posibles dentro de las secuencias de ADNc de estas clonas, ni se tomaron en cuenta el resto de los aminoácidos de los péptidos originales, los epítopes que se seleccionaron tienen la capacidad de estimular favorablemente linfocitos B y T (Toledo *et al.*, 2001).

Llama también la atención el hecho de que las secuencias de *T. solium* reportadas con las que se alinearon los péptidos pertenecen todas al estado larvario de este parásito, es decir, al cisticerco. A pesar de que hay más secuencias del gusano (14113) reportadas que de larva (9157), sólo se alineó con las segundas. No obstante, las inmunohistoquímicas previas (Toledo *et al.*, 1999, 2001) han demostrado la presencia de los péptidos en ambos estadios, así como en las oncosferas.

Existen algunas consideraciones técnicas que surgen de este trabajo. Durante la amplificación se observó que las reacciones son muy sensibles a la calidad del ADN. Un ADN recién extraído no se amplificó de igual forma que uno guardado durante meses a -20°C. Aun cuando al correr los ADN en geles de agarosa se veían íntegros, es probable que dentro de la misma muestra existieran fragmentos imposibles de amplificar (Golenberg *et al.*, 1996). Puesto que en la mayoría de los casos se daba un efecto de todo o nada, se consideró también la posibilidad de compuestos inhibitorios en las alícuotas de ADN (Sachse y Frey, 2003). La estrategia que se propone para evitar este problema en el futuro es estandarizar la extracción y purificación del ADN. Durante el proyecto se utilizaron dos kits y un protocolo, además de que el material inicial no fue el mismo para todas las

purificaciones. Igualmente, se requiere un método confiable para cuantificar las muestras, pues aunque el Nanodrop es muy práctico, se conocen sus problemas de reproducibilidad (Nanodrop, 2007). Muestras que aparentemente contenían sólo 5 ng/ $\mu$ l, al correr 5  $\mu$ l en un gel de agarosa al 0.8% se comprobó que tenían una mayor concentración.

### 7.1 KETc1

Durante la amplificación de las regiones homólogas de KETc1, se identificaron dos productos, uno muy tenue correspondiente al peso molecular calculado y otro bastante claro de alrededor de 1000 pares de bases. Alineando las secuencias de ADNc con las de ADN genómico, se encontró que existen dos probables intrones de alrededor de 80 pares de bases cada uno. Las bandas de diferentes tamaños se pueden explicar por una mala temperatura de alineación que hace que los oligonucleótidos se peguen de forma inespecífica y se obtengan varias bandas (Dieffenbach y Dveksler, 2003). Esto podría explicar las bandas múltiples incluso en el ADNc. La existencia de estas bandas múltiples, sin embargo, no impidió encontrar las secuencias homólogas del péptido.

En cuanto a las secuencias de los péptidos, para KETc1 es claro que hay variaciones específicas entre *Echinococcus* y *Taenia*. Mientras que el séptimo aminoácido del péptido en *T. solium* y *T. saginata* es una leucina, en *E. granulosus* y *E. multilocularis* es una serina. En las posiciones 9 y 12 también hay cambios específicos de género, una treonina por una isoleucina y una arginina por una glutamina. A nivel estructural, el cambio más significativo es el de arginina por glutamina, pues pierde una carga positiva importante. Al analizar su potencial antigénico por medio de la aplicación Syfpeithi<sup>15</sup>, la serina y la

---

<sup>15</sup> <http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>

arginina sustituidas pueden funcionar como residuos ancla si son procesadas por el MHC tipo I (Goldsby *et al.*, 2002). El tamaño del péptido, sugiere que este péptido se procesa por este tipo del complejo principal de histocompatibilidad. Una evaluación con esta misma aplicación de los péptidos de *E. granulosis* y *E. multilocularis* arrojaron que, en efecto, podrían ser mucho menos antigénicos que el péptido original. Además de las variaciones entre géneros, *T. saginata* presenta dos cambios (serina→leucina y valina→alanina). El cambio de serina a leucina igualmente disminuye la antigenicidad como epítoto comparado con la secuencia original.

Cabe destacar que la mayoría de los cambios anteriores están dados por variaciones en el tercer nucleótido de los codones. A pesar de que estos cambios normalmente no tienen gran repercusión a nivel estructural (Di Giulio, 1989), en este caso el cambio de TCG, a TCA (arginina a glutamina) sí puede tener repercusiones a nivel de reconocimiento/ unión del antígeno. De los cinco aminoácidos que se encuentran conservados en todas las secuencias, los aminoácidos serina y treonina en la cuarta y quinta posición podrían ser importantes para su efectividad como antígenos. Se necesitarán más experimentos en el futuro para evaluar si el péptido de *T. crassiceps* es efectivo para prevenir las infecciones de los céstodos estudiados o si se requieren las secuencias específicas para cada especie.

Durante las alineaciones se identificó un péptido de menor longitud, pero que comparte aminoácidos con la secuencia de *T. crassiceps*, perteneciente a *Aspergillus fumigatus*. La secuencia que traducida resulta en PMSTPSAT y que tiene el registro de gen número 5077130 (GenBank), se identificó como una proteína de superficie dentro de una colección de ARNs usados para el tratamiento o diagnóstico de infecciones con este hongo. Es muy probable que los péptidos de la

vacuna también sean proteínas de superficie por los resultados de las inmunohistoquímicas previos que muestran los tegumentos, es decir, la capa más externa del parásito, como la parte en donde se localizan estos péptidos principalmente. El hecho de que se encontraran en la parte externa podría explicar el porqué se reconocen en los sueros de pacientes infectados. Al tratar de atacar al parásito los macrófagos desprenden estructuras (Goldsby *et al.*, 2002, Abbas *et al.*, 2007) del tegumento del céstodo que las células presentadoras de antígeno pueden atrapar y procesar por ambos tipos de MHC, aunque preferentemente por el tipo II (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

## 7.2 KETc12

KETc12 es un péptido pequeño, por lo cual su antigenicidad está restringida. Su tamaño también hace pensar que se trata de un péptido capaz de ser reconocido por moléculas del MHC clase I. Su antigenicidad evaluada con la aplicación Syfpeithi no es tan buena como la de los otros dos péptidos, aunque las leucinas y la asparagina en el péptido de *T. crassiceps* pudieran ser importantes.

En cuanto a las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos provenientes de la secuencia de la biblioteca de *Full Lengths* (genoma *T. solium*) (puesto que esa biblioteca no incluye el 100% del ADN de *T. solium*) es posible que todavía no se haya secuenciado o incluido la región homóloga de KETc12. Las alineaciones de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de *T. crassiceps*, *T. solium* y *E. multilocularis* son bastante buenas, no tienen tantas posiciones vacías (gaps) y el contexto de la zona que codifica a KETc12 es bastante similar. Éste no es el caso al alinear las secuencias de los *Full Lengths*. Aunque codifica para un aminoácido similar, la pequeña porción de secuencia que se llega a alinear tiene demasiados cambios a nivel de ADN, más de los que se encuentran al alinear



las otras secuencias. Se puede pensar en muchas mutaciones sinónimas, pero sería raro que sólo se hubiera mantenido lo que codifica para el péptido y que todo lo demás de la secuencia sea tan diferente.

Por otro lado están los resultados obtenidos al usar los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia homóloga de KETc12 en *E. multilocularis*. Mediante la amplificación de ADN de *T. solium* y su posterior secuenciación, se confirmó que existe un codón de término intermedio. Observando las secuencias en los diferentes céstodos pareciera que en este caso sí se trata de una mutación sin sentido (nonsense), pues mientras que el resto de los parásitos tienen TTG, *T. solium* tiene TAG. Esta mutación podría dar a entender que KETc12 no existe tal cual en *T. solium* y explicaría en parte su menor efectividad al probarlo de forma individual (Toledo *et al.* 2001; Manoutcharian *et al.* 1995). Será interesante, sin embargo, el poder averiguar si esta mutación se encuentra también en *T. saginata*. Es raro que los oligonucleótidos hayan amplificado en *T. solium* y en *T. saginata*, no. Las secuencias de ambos parásitos son prácticamente idénticas, pero el hecho de escoger la secuencia de inicio de manera aleatoria significó que pudiera haber variaciones importantes justo en esa región. Otra posibilidad es que la temperatura de alineación no haya sido la adecuada para amplificar el ADN de *T. saginata*.

Al comparar las secuencias homólogas de aminoácidos, se observa, dejando a un lado las dos secuencias de *Full Lengths*, que a partir de la tercera posición los aminoácidos están conservados, a excepción de un cambio propio de género. Las especies de *Taenia* tienen una cisteína en la séptima posición, mientras que las de *Echinococcus* tienen una tirosina. Tras realizar el análisis de epítopes se observa, sin embargo, que este cambio específico de especie no afecta de manera importante la antigenicidad del péptido. Las dos primeras posiciones, a pesar de contar con aminoácidos

diferentes en *T. crassiceps* y en las especies de *Echinococcus*, tampoco ofrecen ventajas significativas como epítopes. Los aminoácidos que ocupan las primeras posiciones no tienen cargas importantes que modifiquen la forma en cómo se estarían uniendo al complejo principal de histocompatibilidad. Antes de probar su efectividad como epítoto protector para los céstodos estudiados, quizás habría que re-evaluar el rol de este péptido como parte de la vacuna S3Pvacen infecciones por *T. solium*.

### 7.3 GK-1

La única dificultad que se presentó al trabajar con este péptido fue el requerimiento de ADN de excelente calidad para amplificar. En la Figura 6.3, donde se muestra la amplificación, se pueden observar también bandas de mayor peso molecular al esperado. Además de que existe una secuencia que probablemente es un intrón, quizás sea necesario ajustar las temperaturas de alineación para restringir el pegado y obtener una sola banda. Dentro de este trabajo, las bandas que se enviaron a secuenciar fueron siempre las más claras y siempre incluyeron la secuencia que codifica al péptido.

En cuanto a la secuencia del péptido, el grado de conservación, aun tratándose de un péptido más largo, es de importancia para su función. A pesar de que el artículo de Toledo *et al.* (1999), donde se caracterizó este péptido, menciona que es capaz de inducir una mayor proliferación de linfocitos CD8<sup>+</sup> por su longitud, es más probable que se una al MHC clase II y que produzca una mayor activación y proliferación de linfocitos CD4<sup>+</sup>. Además, mediante la herramienta de predicción de epítopes antes mencionada, se observó que el péptido es mucho más antigénico completo que fragmentado. Esta predicción se confirmó al inmunizar ratones hembra de la cepa BALB/cAnN con

una versión truncada de GK-1 (10 aminoácidos) y observar que protegía menos al ser desafiados con *T. crassiceps* que la versión original (resultados no publicados). Esto no descarta por completo la posibilidad de que el péptido sea blanco de proteólisis al introducirse en el organismo del hospedero.

De usarse la vacuna S3Pvac en los céstodos estudiados, es probable que GK-1 se pudiera emplear sin modificación alguna.

## 8. CONCLUSIONES

- Los 3 péptidos, KETc1, KETc12 y GK-1, cuentan con péptidos homólogos en los céstodos estudiados: *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus granulosus*.
- El péptido más conservado entre estas especies es GK-1.
- El péptido con más cambios entre estas especies es KETc12.
- En KETc1 y KETc12 existen cambios de aminoácidos específicos de género (*Echinococcus* o *Taenia*).
- La homología encontrada en GK-1 y KETc1 permite considerar que los péptidos de *T. crassiceps* podrían proteger efectivamente contra las otras cestodiasis.
- La efectividad como inmunógeno protector de KETc12 requiere ser considerada de acuerdo a la secuencia en cada una de las especies.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., A.H.Lichtman, y Pillai, S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology* (6th ed.). Saunders-Elsevier.
- Audibert, F., Jolivet, M., Chedid, L., Arnon, R., y Sela, M. (1982). Successful immunization with a totally synthetic diphtheria vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 79, 5042-5046.
- Baker, J. R., Muller, R., y Rollinson, D. (2000). *Advances in Parasitology* (Vol. 51). Academic Press.
- Bush, A. O., Fernández, J. C., Esch, G. W., y Seed, J. R. (2001). *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press.
- Cai, X., Chai, Z., Jing, Z., Wang, P., Luo, X., Chen, J., Dou, Y., Feng, S., Su, C. y Jin, J. (2001). Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* , 32 Suppl 2, 105-110.
- Carpio, A. (2002). Neurocysticercosis: an update. *The Lancet Infectious Diseases* , 2, 751-762.
- de, A. S., Villalobos, N. M., Nava, G., Toledo, A., Martinez, J. J., Plancarte, A., Rodarte, L. F., Fragoso, G., y Sciutto, E. (2005). Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine* , 23, 4062-4069.
- Dempster, P., Robinson, C., y Harrison, G. (1996). Parasite vaccine development: large-scale recovery of immunogenic *Taenia ovis* fusion protein GST-45W(B/X) from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Parasitol Res.* , 82, 291-296.
- Dieffenbach, C. W., y Dveksler, G. S. (2003). *PCR Primer: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- Dorny, P., y Praet, N. (2007). *Taenia saginata* in Europe. *Vet Parasitol* , 149, 22-24.
- Eckert, J., y Deplazes, P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* , 17, 107-135.
- Ferrer, E., Benitez, L., Foster-Cuevas, M., Bryce, D., Wamae, L. W., Onyango-Abuje, J. A., Garate, T., Harrison, L.J.S., y Parkhouse, R.M.E. (2003). *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Veterinary Parasitology* , 111, 83-94.
- Flisser, A., Rodríguez-Canul, R., y Willingham, A. L. (2006). Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments. *Veterinary Parasitology* , 139, 283-292.
- Flisser, A., Viniestra, A.-E., Aguilar-Vega, L., Garza-Rodriguez, A., Maravilla, P., y Avila, G. (2004). Portrait of human tapeworms. *J Parasitol* , 90, 914-916.
- Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomeli, C., Hernandez, M., y Sciutto, E. (1998). Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* , 66, 760-764.
- Garcia, H. H., Moro, P., y P.M.Schantz. (2007). Zoonotic helminth infections of humans: echinococcosis, cysticercosis and fascioliasis. *Curr Opin Infect Dis* , 20, 489-494.

Gauci, C., y Lightowlers, M. W. (2003). Molecular cloning of genes encoding oncosphere proteins reveals conservation of modular protein structure in cestode antigens. *Molecular and Biochemical Parasitology* , 127, 193-198.

Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Larralde, C., Hernandez, M., Almagro, J. C., Viveros, M., Sotelo, J., Garcia, E., y Scitutto, E. (1996). Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett* , 49, 185-189.

Giulio, M. D. (1989). The extension reached by the minimization of the polarity distances during the evolution of the genetic code. *J Mol Evol* , 29, 288-293.

Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Kuby, J., y Osborne, B. A. (2002). *Immunology* (5ta ed.). W.H. Freeman.

Golenberg, E., Bickel, A., y Weihs, P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucl. Acids Res.* , 24, 5026-5033.

Guo, A., Jin, Z., Zheng, Y., Hai, G., Yuan, G., Li, H., y Cai, X. (2007). Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. *Vaccine* , 25, 170-175.

Guo, Y., Sun, S., Zhang, Y., Chen, Z., Wang, K., Huang, L., Zhang, S., Zhang, H.Y., Wang, Q.M., Wu, D., y Zhu, W.J. (2004). Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine* , 22, 3841-7.

Huerta, M., de, A. S., Fragoso, G., Toledo, A., Villalobos, N., Hernández, M., Gevorkian, G., Acero, G., Díaz, A., Alvarez, I., Avila, R., Beltrán, C., Garcia, G., Martinez, J. J., Larralde, C., y Scitutto, E. (2001). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* , 20, 262-266.

Kouguchi, H., Matsumoto, J., Katoh, Y., Oku, Y., Suzuki, T., y Yagi, K. (2007). The vaccination potential of EMY162 antigen against *Echinococcus multilocularis* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 363, 915-920.

Larralde, C., y de Aluja, A. S. (2006). *Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud*. FCE, Secretaría de Salud, INSP, Fundación Mexicana para la Salud.

Lawson, J., y Gemmell, M. (1989). The ovine cysticercosis as models for research into the epidemiology and control of the human and porcine cysticercosis *Taenia solium*. *Acta Leiden.* , 57, 165-180.

Lightowlers, M. W., Colebrook, A. L., Gauci, C. G., Gauci, S. M., Kyngdon, C. T., Monkhouse, J. L., y otros. (2003). Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Vet Parasitol* , 115, 83-123.

Lightowlers, M. W., Flisser, A., Gauci, C. G., Heath, D. D., Jensen, O., y Rolfe, R. (2000). Vaccination Against Cysticercosis and Hydatid Disease. *Parasitol Today* , 16, 191-196.

- Lightowlers, M. W., Lawrence, S. B., Gauci, C. G., Young, J., Ralston, M. J., y Heath, D. D. (1996). Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol.* , 18, 457-62.
- Lightowlers, M. W., Rolfe, R., y Gauci, C. G. (1996). *Taenia saginata*: Vaccination against Cysticercosis in Cattle with Recombinant Oncosphere Antigens. *Experimental Parasitology* , 84, 330-338.
- Manoutcharian, K., Diaz-Orea, A., Gevorkian, G., Fragoso, G., Acero, G., Gonzalez, E., Aluja, A. De, Villalobos, N., Gomez-Conde, E., y Sciutto, E. (2004). Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* , 99, 11-24.
- Manoutcharian, K., Larralde, C., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Govezensky, T., Baca, M., Sciutto, E., Aluja, A., Villalobos, N., y Rodarte, L.F. (1995). Advances in the Development of a Recombinant Vaccine against *Taenia solium* Pig Cysticercosis. *Vaccines 95* (págs. 63-68). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L. F.; y Sciutto, E. (1996). Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* , 82, 250-254.
- McManus, D. P., Zhang, W., Li, J., y Bartley, P. B. (2003). Echinococcosis. *Lancet* , 362, 1295-1304.
- Morales, J., Martínez, J. J., Manoutcharian, K., Hernández, M., Fleury, A., Gevorkian, G., Acero, G.; Blancas, A., Toledo, A., Cervantes, J., Maza, V., Quet, F., Bonnabau, H., de Aluja, A. S., Fragoso, G., Larralde, C., y Sciutto, E. (2008). Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine* , 26, 2899-2905.
- Müller-Schollenberger, V., Beyer, W., Schnitzler, P., Merckelbach, A., Roth, S., Kalinna, B. H., y Lucius, R. (2001). Immunisation with *Salmonella typhimurium*-delivered glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protects mice against challenge infection with *Echinococcus multilocularis* eggs. *Int J Parasitol* , 31, 1441-1449.
- Nisbet, A. J., Halliday, A. M., Parker, L., Smith, W. D., Kenyon, F., Knox, D. P., y Huntley, J. F. (2008). *Psoroptes ovis*: Identification of vaccine candidates by immunoscreening. *Experimental Parasitology* , 120, 194-199.
- OMS. (2009). Taeniasis/Cysticercosis.
- Osborn, P., y Heath, D. (1982). Immunisation of lambs against *Echinococcus granulosus* using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro. *Res Vet Sci.* , 33, 132-3.
- Purcell, A. W., McCluskey, J., y Rossjohn, J. (2007). More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design. *Nat Rev Drug Discov* , 6, 404-414.
- Rodríguez, M. L., Rodriguez, S., Gonzalez, A. E., Verastegui, M., Bernal, T., Jimenez, J. A., y García, H.H. (2006). Can *Taenia solium* Latent Post-Oncospheral Stages be Found in Muscle Tissue of Cysticercosis-Infected Pigs (*Sus scrofa*)? *Journal of Parasitology* , 92, 199-201.

- Rosas, G., Cruz-Revilla, C., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Perez, A., Bonilla, M. A., Rosales, R., y Sciutto, E. (1998). *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol* , 84, 516-523.
- Sachse, K., y Frey, J. (2003). *PCR detection of microbial pathogens*. Humana Press.
- Schantz, P. M. (2006). Progress in diagnosis, treatment and elimination of echinococcosis and cysticercosis. *Parasitol Int* , 55 Suppl, S7 - S13.
- Sciutto, E., Rosas, G., Hernandez, M., Morales, J., Cruz-Revilla, C., Toledo, A., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Blancas, A., Acero, G., Hernandez, B., Cervantes, J., Bobes, R. J., Goldbaum, F. A., Huerta, M., Diaz-Orea, A., Fleury, A., de, A. S., Cabrera-Ponce, J. L., Herrera-Estrella, L., Fragoso, G., y Larralde, C. (2007). Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine* , 25, 1368-1378.
- Segura-Velazquez, R., Perez-Torres, A., Rosas, G., Toledo, A., Restelli, M., Acosta, E., Corral, R., Rosetti, F., Fragoso, G., Grinstein, S., y Sciutto, E. (2006). A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine* , 24, 1073-1080.
- Sheikh, M., Sheikh, I., Ali, I., y Reshi, F. (2008). Nasal Expulsion of *Taenia saginata*: a Rare Route of Expulsion. *The Internet Journal of Surgery* , 16.
- Shi, Z., Wang, Y., Li, Z., Li, Z., Bo, Y., Ma, R., y Zhao, W. (2009). Cloning, expression, and protective immunity in mice of a gene encoding the diagnostic antigen P-29 of *Echinococcus granulosus*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* , 41, 79-85.
- Siles-Lucas, M., Merli, M., Mackenstedt, U., y Gottstein, B. (2003). The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine* , 21, 431-439.
- Singh, G., y Prabhakar, S. (2002). *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science (Illustrated ed.). CABI.
- Singleton, P. (2004). *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine* (6 ed.). Wiley.
- Technical Support Bulletin: Sample Reproducibility on the NanoDrop ND-1000 and ND-8000 8-Sample Spectrophotometers*. (2007). Nanodrop Inc.
- Thomasson-Crompton, D., y Savioli, L. (2006). *Handbook of Helminthiasis for Public Health*. CRC Press.
- Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernandez, M., Gevorkian, G., Lopez-Casillas, F., Hernandez, B., Acero, G., Huerta, M., Larralde, C., y Sciutto, E. (2001). Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* , 69, 1766-1773.
- Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernandez, M., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Garfias, C. K., Vazquez, R., Terrazas, I., y Sciutto, E. (1999). Towards a *Taenia solium*



cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* , 67, 2522-2530.

Toledo-Rojas, A. A. (1999). *Identificación de Epitopos Protectores en Antígenos Recombinantes de Taenia crassiceps*. Facultad de Ciencias, UNAM.

Valdez, F., Hernandez, M., Govezensky, T., Fragoso, G., y Sciutto, E. (1994). Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J Parasitol* , 80, 931-936.

Wang, Q., Sun, S., Hu, Z., Wu, D., y Wang, Z. (2003). Immune response and protection elicited by DNA immunisation against *Taenia* cysticercosis. *Vaccine* , 21, 1672-1680.

Wanzala, W., Onyango-Abuje, J. A., Kang'ethe, E. K., Zessin, K. H., Kyule, N. M., O., M. P., Baumann, O. M. P., Ochanda, H., S., y Harrison, L.J.S. (2003). Control of *Taenia saginata* by post-mortem examination of carcasses. *Afr Health Sci* , 3, 68-76.

White Jr., A. (2007). Epidemiology, transmission, and prevention of cysticercosis. (2007) *UptoDate Patients*.

Willingham III, A., y Schantz, P. (2004). Assessing the burden of *Taenia solium* cysticercosis and echinococcosis. *Vet. Parasitol.* , 125, 183-202.

Wu, L., Diao, Z., Deng, X., Gao, J., Zhou, Z., Liu, Y., y Wang, Y. (2005). DNA vaccine against *Taenia solium* cysticercosis expressed as a modified hepatitis B virus core particle containing three epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. *J Nanosci Nanotechnol* , 5, 1204-1210.

Yeh, J., y Sheffield, J. S. (2008). Cysticercosis: A Zebra in the Neighborhood. *Virtual Mentor: American Medical Association Journal of Ethics* , 10, 220-223.

Zhang, W., Zhang, Z., Shi, B., Li, J., You, H., Tulson, G., Dang, X., Song, Y., Yimiti, T., Wang, J., Jones, M. K., y McManus, D. P. (2006). Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans. *J Infect Dis* , 194, 966-974.

## LISTA DE ABREVIATURAS

(En orden de aparición)

|           |  |
|-----------|--|
| PCR       | Reacción en cadena de la polimerasa  |
| ADN (DNA) | Ácido desoxirribonucleico  |
| GST       | Glutación-S-Transferasa  |
| RT-PCR    | PCR de retrotranscripción  |
| ADNc      | ADN complementario   |
| ARN       | Ácido ribonucleico   |
| kDa       | Kilodalton   |
| PBS       | Buffer de fosfatos salino  |
| dNTP      | Desoxiribonucleótido trifosfato  |
| TAE       | Buffer Tris-acetato-EDTA   |
| pb        | Pares de bases   |
| BLAST     | Herramienta Básica de Búsquedas de Alineaciones Locales (Basic Local Alignment Search Tool ) |

## FIGURAS

Figura 1.1: Los diferentes estadios de *Taenia solium*.

Figura 1.2: Ciclos de vida de *Taenia solium* y *Taenia saginata*

Figura 1.3: Ciclos de vida de *Echinococcus granulosus* y *multilocularis*

Figura 1.4: Estructura del péptido GK-1

Figura 1.5: Localización de los péptidos en diferentes estadios de *T. crassiceps* y *T. solium* por inmunohistoquímica

Figura 5.1: Estrategias empleadas en el proyecto.

Figura 5.2: Oligonucleótidos empleados para la amplificación de secuencias homólogas de los tres péptidos.

Figura 6.1: Amplificación de secuencias homólogas de KETc1 por PCR.

Figura 6.2: Resultados de la amplificación de regiones homólogas de KETc12 en los diferentes céstodos.

Figura 6.3: Amplificación de regiones homólogas en GK-1(KETc7).

## TABLAS

Tabla 1: Combinaciones de oligonucleótidos para amplificar la región homóloga de KETc1.

Tabla 2: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidos al secuenciar los productos de PCR de KETc1.

Tabla 3: Combinaciones de oligonucleótidos contemplados para amplificar KETc12.

Tabla 4: Secuencias homólogas de nucleótidos y aminoácidos halladas en KETc12.

Tabla 5: Diseños de PCR para amplificar KETc7.

Tabla 6: Resultados de la secuenciación de regiones homólogas amplificadas de GK-1.